



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2009

**Adelaide Sofia Cabral** **Estudo da Relação entre Parâmetros de Qualidade de**  
**Ribeiro Barroco Vieira** **Rolhas de Cortiça e a sua Contaminação com 2,4,6-**  
**de Sousa e Silva** **Tricloroanisol**



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
**2009**

**Adelaide Sofia Cabral  
Ribeiro Barroco Vieira  
de Sousa e Silva**

**Estudo da Relação entre Parâmetros de Qualidade de  
Rolhas de Cortiça e a sua Contaminação com 2,4,6-  
Tricloroanisol**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Controlo da Qualidade realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Armando Silvestre, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação da Professora Doutora Sílvia M. Rocha Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus Pais, Carlos Manuel e Maria Pia, à minha Irmã Luísa e ao meu marido Ricardo.

## **o júri**

presidente

Prof. Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira  
professor associado do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor José Manuel Nogueira  
professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Prof. Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre  
professor associado do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Sílvia Maria Rocha Simões Carriço  
professora auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Ao Professor Doutor Armando Silvestre e à Professora Doutora Sílvia M. Rocha, por terem proporcionado a realização deste trabalho, pela orientação científica e pelo seu espírito crítico.

Ao Professor Doutor António Barros pela preciosa ajuda e disponibilidade na análise de dados.

Ao Dr. Luís Silva, Administrador da empresa L. V. Silva, pela disponibilização do laboratório e equipamento de GC-ECD e pela tolerância nos meus horários de trabalho.

Aos meus Pais, pelo apoio incondicional, pela presença constante, pela ajuda na manutenção da calma nos momentos mais difíceis, um obrigada muito especial.

À minha Irmã que sempre me motivou e ajudou ao longo deste percurso.

A toda a minha família que me incentivou neste caminho, por vezes árduo.

Aos meus amigos, em especial à Paula e à Célia pelas palavras de força e incentivo que sempre tiveram.

E ao meu marido, Ricardo, que contribuiu sempre com todo o seu apoio e com palavras de incentivo nos momentos mais difíceis, pela nossa cumplicidade.

## palavras-chave

Rolhas de cortiça, HS-SPME/GC-ECD, TCA, Parâmetros de Classificação, Qualidade Visual, Calibre, Fornecedor.

## resumo

A cortiça assume uma posição de destaque no contexto da economia portuguesa, pelo nível de exportações, pelo volume de emprego associado, e pelo papel determinante na economia de algumas regiões do país.

As rolhas de cortiça natural constituem o produto mais importante de todo o sector industrial corticeiro, sendo a sua classificação (em função de alguns parâmetros de qualidade), fundamental para estabelecer o seu valor comercial e consequentemente o seu mercado potencial.

A maioria dos estudos sobre defeitos de aroma associados à rolha de cortiça tem incidido quase exclusivamente sobre o 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Isto porque o TCA tem vindo a ser reconhecido como sendo o principal responsável (em mais de 80% dos casos) por defeitos sensoriais no vinho associado à rolha de cortiça. Os estudos de caracterização sensorial da cortiça têm-se restringido apenas à verificação da qualidade organoléptica. Na indústria corticeira e vitivinícola, pensa-se ainda (sem suporte científico), que poderá existir uma relação entre a quantidade de TCA e alguns parâmetros de classificação das rolhas de cortiça, nomeadamente a qualidade visual e o calibre.

O presente trabalho tem como objectivo verificar a existência de relações entre a quantidade de TCA presente nas rolhas de cortiça e os referidos parâmetros de classificação (qualidade visual, calibre e ainda o fornecedor) de modo a encontrar dados objectivos que fundamentem ou não a relação empírica estabelecida no meio corticeiro.

Com base na norma ISO/CD 20752.2 foi implementado numa indústria corticeira uma metodologia para quantificar o TCA por HS-SPME/GC-ECD (microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça seguida por análise por cromatografia em fase gasosa com detector de captura electrónica). Numa primeira fase, foram optimizados vários parâmetros analíticos desta metodologia: gama de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia. Esta metodologia apresenta uma boa linearidade ( $R^2 = 0,9964$ ) para a gama concentrações testada (0,63 – 16,75 ng/L), com limite de detecção de 0,21 ng/L e limite de quantificação de 0,63 ng/L, a repetibilidade e reprodutibilidade correspondem a coeficientes de variação de 1% e 2%, respectivamente. Relativamente ao estudo da robustez, o desvio padrão de precisão intermédia para as concentrações estudadas 3,18 e 9,90 ng/L foi de 1,2% e 0,74% respectivamente.

Esta metodologia foi aplicada na determinação de TCA em rolhas de cortiça de diferentes qualidades visuais e calibres, obtidas a partir de nove fornecedores, ao longo do ano de 2007. Os valores de TCA mais baixos estão associados às qualidades visuais Flôr e Extra e calibres superiores (54x24 mm e 49x24 mm). Esta tendência verifica-se independentemente dos fornecedores. No entanto, é de realçar o facto da contribuição significativa do parâmetro fornecedor na interpretação de parâmetros que possam estar relacionados com o teor de TCA, pois verificou-se que há uma tendência clara para os teores de TCA estarem relacionados com o fornecedor, o que se confirma para todas as qualidades visuais e calibres, ao longo do período de análise. Finalmente, este estudo indica que para o ano de 2007 existe uma relação entre o teor de TCA e a qualidade visual, calibre e o fornecedor das rolhas de cortiça. A confirmação da tendência identificada com este estudo deve ser consolidada por análise de rolhas de cortiça ao longo de vários anos.

**keywords**

Cork stoppers, HS-SPME/GC-ECD, TCA, Classification Parameters, Visual Quality, Size, Supplier.

**abstract**

Cork has a key position in the Portuguese economy due to the level of exports, the volume of employment involved, and due to the economic impact in some regions of the country.

Natural cork stoppers are the most important product of the cork industry, and, in that perspective, their classification (according to some parameters of quality) is essential to establish their commercial value and therefore their market value.

Most studies on defects associated with the aroma of the cork stopper have been focused on the analysis of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) which has been recognized as the main responsible (in more than 80% of cases) of sensory defects associated with the wine cork stopper. The studies of sensory characterization of cork have been restricted only to verify the organoleptic quality. In cork and wine industries, it is thought (without scientific support) that there may be a relationship between the amount of TCA and some cork stoppers classification parameters, in particular the visual quality and size.

This work aims to verify the existence of relationships between the amount of TCA present in cork stoppers and those parameters of classification (visual quality, size and the supplier) in order to find out objective results that may be used to support (or not) the empirical relationship established in the cork and wine industries.

Based on ISO / CD 20752.2 a methodology to quantify the TCA by HS-SPME/GC-ECD (solid phase microextraction in the headspace region associated with gas chromatography with electronic capture detector) in cork industry has been implemented. Initially several key parameters of this analytical methodology were optimized, namely: range of linearity, limit of detection and limit of quantification, repeatability, reproducibility and intermediate precision. This methodology provides a good linearity ( $R^2 = 0,9964$ ) for the concentration range tested (0,63 to 16,75 ng / L), the detection and the quantification limits are 0,21 ng/L and 0,63 ng/L, respectively, with a repeatability and reproducibility coefficients of variation corresponding to the 1% and 2% respectively. For the robustness study, the standard deviation of precision for intermediate concentrations studied 3,18 and 9,90 ng / L was 1,2% and 0,74% respectively.

This methodology was applied to the analysis of TCA in cork stoppers with different visual qualities and sizes, obtained from nine suppliers during 2007.

It was found that the lower TCA values are associated with visual quality Flôr and Extra of higher sizes (54x24 mm and 49x24 mm). However, it should be noted the significant contribution of the supplier in the interpretation of those parameters, that may be related to the level of TCA, as it was found that there is a clear trend for the levels of TCA in relation to the supplier, which is confirmed for all the visual qualities and sizes, during the period of analysis. Finally, this study indicates that for 2007 there is a relationship between the level of TCA and visual quality, size and supplier of cork stoppers. The confirmation of the trend identified in this study should be consolidated with analysis of cork stoppers for several years.



## Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 A Cortiça .....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Estrutura Celular da Cortiça .....	10
1.1.2 Composição Química da Cortiça.....	11
1.1.2.1Fracção Volátil.....	16
<b>1.2 Da Cortiça à Rolha .....</b>	<b>17</b>
1.2.1 Fabricação de Rolhas de Cortiça Natural .....	18
<b>1.3 Potenciais Parâmetros de Qualidade de Rolhas de Cortiça Natural .....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Padrão Visual – Qualidade Visual .....	20
1.3.2 Dimensões – Calibre.....	21
1.3.3 Fornecedores .....	21
<b>1.4 O 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) nas rolhas de cortiça .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 O TCA nos vinhos .....</b>	<b>24</b>
<b>1.6 A Micro-extracção em Fase Sólida (SPME) .....</b>	<b>25</b>
1.6.1 Fase Estacionária da Técnica de SPME .....	28
1.6.2 Parâmetros que influenciam as condições experimentais .....	31
1.6.2.1 Na sorção .....	31
1.6.2.2 Na dessorção .....	32
<b>1.7 Metodologias de SPME para Determinação do TCA em Cortiça e em Vinho .....</b>	<b>32</b>
<b>1.8 Validação do Método Analítico .....</b>	<b>34</b>
1.8.1 Linearidade .....	34
1.8.2 Limiares Analíticos.....	35
1.8.2.1 Limite de Detecção .....	35
1.8.2.2 Limite de Quantificação .....	36
1.8.3 Precisão .....	36
1.8.4 Robustez.....	39
<b>1.9 Enquadramento e Objectivos do Trabalho.....</b>	<b>40</b>
<b>2. Procedimento Experimental.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Reagentes e Materiais.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 Equipamento.....</b>	<b>43</b>
<b>2.3 Amostragem .....</b>	<b>44</b>

<b>2.4</b>	<b>Preparação da Amostra e Metodologia de HS-SPME/GC-ECD .....</b>	<b>46</b>
2.4.1	Análise por GC-ECD .....	46
<b>2.5</b>	<b>Tratamento de Dados.....</b>	<b>47</b>
<b>3.</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Validação do Método HS-SPME/GC-ECD.....</b>	<b>51</b>
3.1.1	Linearidade do Método de HS-SPME/GC-ECD .....	51
3.1.2	Limites Analíticos.....	51
3.1.3	Precisão do Método de HS-SPME/GC-ECD .....	52
3.1.3.1	Repetibilidade .....	52
3.1.3.2	Reprodutibilidade.....	53
3.1.4	Robustez do Método de HS-SPME-GC-ECD .....	54
<b>3.2</b>	<b>Determinação do 2,4,6-TCA em Rolhas de Cortiça .....</b>	<b>56</b>
3.2.1	Possível Relação Fornecedor, Calibre e Qualidade Visual .....	56
<b>4.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>73</b>
<b>5.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>77</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 - Cortiça amadia em corte transversal (à esquerda) e tangencial (à direita), onde são visíveis os canais lenticulares que atravessam a cortiça e determinam a sua porosidade <sup>3</sup> . ....	9
Figura 2 - Fotografia de microscopia electrónica de varrimento de células de cortiça de reprodução. Corte tangencial evidenciando o arranjo em forma de favo de mel (ampliação de 500 vezes). ....	11
Figura 3 – Modelo proposto para a estrutura celular da cortiça.....	12
Figura 4 – Unidade básica C <sub>9</sub> da lenhina da cortiça: Guaiacilpropano <sup>32</sup> .....	14
Figura 5 - Estrutura da glucose (a) e da ligação glicosídica β(1-4) entre duas moléculas de glucose formando a celobiose (b); estrutura da celulose (c). ....	14
Figura 6 - Tipos de rolhas produzidas pela indústria da cortiça.....	18
Figura 7 - Esquema do Processo Produtivo da Rolha Natural .....	19
Figura 8 - Estrutura e fórmula química de compostos susceptíveis de provocar defeitos em vinhos, associados à cortiça .....	22
Figura 9 - Etapas de um ciclo de SPME .....	27
Figura 10 - Esquema representativo dos fenómenos de absorção e adsorção dos analitos pela fase estacionária da fibra de SPME <sup>96</sup> .....	29
Figura 11 - Dispositivo Comercial de SPME .....	30
Figura 12 - Exemplos de disposição de extracção por SPME <sup>96</sup> .....	31
Figura 13 – Estrutura e fórmula química dos padrões usados. ....	43
Figura 14- Curva de calibração do TCA.....	51
Figura 15 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F1 calibre 45x24.....	57
Figura 16 - Carta de Distribuição de Amostragem para F1 calibre 49x24.....	57
Figura 17 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F2 calibre 45x24.....	58
Figura 18 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F3 calibre 45x24.....	59
Figura 19 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F4 calibre 45x24.....	60
Figura 20 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F4 calibre 49x24.....	61
Figura 21 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F4 calibre 54x24.....	61
Figura 22 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F5 calibre 45x24.....	62
Figura 23 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F6 calibre 45x24.....	63
Figura 24 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F6 calibre 49x24.....	64
Figura 25 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F7 calibre 45x24.....	65
Figura 26 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F7 calibre 49x24.....	65
Figura 27 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F8 calibre 45x24.....	66
Figura 28 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F8 calibre 49x24.....	67
Figura 29 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F8 calibre 54x24.....	67
Figura 30 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F9 calibre 45x24.....	68

## Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Gráfico demonstrativo dos valores medianos de TCA por Fornecedor, Calibre e Qualidade .....	70
---	----

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Compostos voláteis identificados na cortiça e respectivos descritores de aroma e limites de percepção sensorial <sup>9</sup> .....	17
Tabela 2 - Classificação das Pranchas de Cortiça de acordo com o Calibre <sup>58</sup> .....	21
Tabela 3- Roda dos aromas da cortiça .....	25
Tabela 4 - Algumas características das fibras de SPME disponíveis comercialmente para amostragem <sup>85</sup> .....	28
Tabela 5 - Metodologias de SPME aplicadas a vinho e cortiça para análise de TCA e cloroanisóis presentes ou transmitidos pela cortiça .....	33
Tabela 6 - Tabela de Amostragem de acordo com a NP 2922 para análise do TCA. ....	44
Tabela 7 - Tabela demonstrativa dos estudos efectuados consoante fornecedor, calibre e qualidade. ....	45
Tabela 8 - Número de análises efectuadas por fornecedor, calibre e qualidade visual. ....	45
Tabela 9- Parâmetros estatísticos da curva de calibração do TCA .....	51
Tabela 10- Avaliação da Repetibilidade do Método de HS-SPME/GC-ECD .....	53
Tabela 11 - Avaliação da Reprodutibilidade do Método de HS-SPME/GC-ECD.....	54
Tabela 12 - Avaliação da Precisão Intermédia do Método de HS-SPME/GC-ECD.....	55
Tabela 13 – Resultados obtidos Para a Precisão Intermédia do Método de HS-SPME/GC-ECD .....	55
Tabela 14 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F1 por calibre e qualidade visual .....	56
Tabela 15 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F2 por calibre e qualidade visual .....	58
Tabela 16 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F3 por calibre e qualidade visual .....	59
Tabela 17 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F4 por calibre e qualidade visual .....	60
Tabela 18 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F5 por calibre e qualidade visual .....	62
Tabela 19 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F6 por calibre e qualidade visual .....	63
Tabela 20 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F7 por calibre e qualidade visual .....	64
Tabela 21 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F8 por calibre e qualidade visual .....	66
Tabela 22 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F9 por calibre e qualidade visual .....	68
Tabela 23 – Valores de medianas para TCA em ng/L, relativos às cartas de distribuição de amostragem para Fornecedor, Calibre e Qualidade Visual.....	69
Tabela 24 - Percentagens relativas aos valores de mediana de TCA menores, iguais e superiores aos limites de percepção sensorial por fornecedor, calibre e qualidade. ....	71

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

AIQ:	Amplitude Interquartilica
CV:	Coeficiente de Variação
CW:	Carbowax <sup>®</sup>
CX:	Carboxen <sup>™</sup>
Da	Dalton
DI:	Direct Immersion (Imersão Directa)
DVB:	Divinylbenzene
GC:	Gas Chromatography (Cromatografia em Fase Gasosa)
GC/ECD:	Gas Chromatography with Electron Capture Detector (Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de Captura Electrónica)
GC/MS:	Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detector (Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de Espectrometria de Massa)
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HS:	Headspace (espaço de cabeça)
ISO:	International Organization for Standardization (Organização Internacional para Padronização)
LA:	Linha de Aviso
LC-MS:	Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detector (Cromatografia Líquida com Detector de Espectrometria de Massa)
LLE:	Liquid-Liquid Extraction (Extracção Líquido-Líquido)
LPS:	Limite de Percepção Sensorial
LOD	Limit of Detection (Limite de detecção)
LOQ:	Limit of Quantification (Limite de Quantificação)
LSC:	Linha Superior de Controlo
MHS-SPME:	Multiple Headspace Solid Phase Microextraction (Múltipla Microextracção em Fase Sólida)
MS:	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massa)
MM:	Massa Molecular
ng/L	Nanogramas/Litro
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear)
NP:	Norma Portuguesa
PA:	Polyacrylate (Poliacrilato)

PCA:	Pentacloroanisol
PDMS:	Polydimethylsiloxane (Polidimetilsiloxano)
PI:	Padrão Interno
<i>R</i> :	Limite de Reprodutibilidade
<i>r</i> :	Limite de repetibilidade
r.p.m.:	rotação por minuto
SBSE:	Stir Bar Sorption Extraction (Extracção Sorptiva em Barra de Agitação)
SPME:	Solid Phase Microextraction (Microextracção em Fase Sólida)
<i>Si</i> ( ):	Desvio padrão de Precisão Intermédia
SVOCs	Semi-Volatile Organic Compounds (Compostos Orgânicos Semi-Voláteis)
TBA:	2,4,6-Tribromoanisol
TCA:	2,4,6-Tricloroanisol
TeCA:	2,3,4,6-Tetracloroanisol
TPR	Templated Resin
v/v:	volume/volume
VOCs	Volatile Organic Compounds (Compostos Orgânicos Voláteis)

## 1. Introdução

---

## 1.1 A Cortiça

A cortiça é um tecido vegetal, suberificado, constituído por células mortas, originado pelo felogene que constitui o revestimento do tronco e ramos do sobreiro, *Quercus suber* L.. O felogene (tecido merismático com capacidade de divisão celular) tem uma espessura unicelular e gera células de cortiça (felema ou súber) para o exterior. Para o seu interior, o felogene origina um outro tecido, o feloderme (células semelhantes às da madeira), que normalmente é constituído por camadas de células. O felema, o felogene e o feloderme constituem no seu conjunto a periderme, constituída quase na totalidade pelo súber<sup>1,2</sup>.

O felogene produz células com uma composição e estrutura diferente das células felémicas normais. Estas células desagregam-se originando uma passagem entre o felogene e o exterior da cortiça. Estas estruturas são os canais lenticulares e originam as discontinuidades que existem no tecido felémico, os *poros* da cortiça (Figura 1). O tipo de poros, a sua dimensão, quantidade e distribuição, são um factor (porosidade) determinante e definidor na qualidade da cortiça<sup>3</sup>.



**Figura 1 - Cortiça amadia em corte transversal (à esquerda) e tangencial (à direita), onde são visíveis os canais lenticulares que atravessam a cortiça e determinam a sua porosidade<sup>3</sup>.**

As características invulgares que a cortiça apresenta face a outros materiais naturais explicam o seu interesse industrial. Propriedades como baixa condutibilidade térmica, relativa impermeabilidade a líquidos e elasticidade, além de se tratar de um tecido homogéneo suficientemente espesso que se regenera naturalmente após cada extracção, tem permitido a sua vasta exploração<sup>4</sup>. Actualmente a principal aplicação é como vedante (nos sectores vinícola e automóvel) ou como isolante e decorativo (no sector de construção civil).

O ciclo de vida da cortiça enquanto matéria-prima começa com a extracção da casca dos sobreiros, o chamado *descortiçamento* e que se realiza durante a fase mais activa do crescimento da cortiça, ente os meses de Maio e Junho até ao final do mês de Agosto<sup>5</sup>.



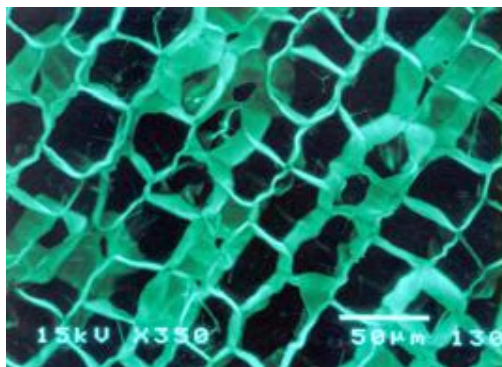
São precisos vinte e cinco anos até que um tronco de sobreiro comece a produzir cortiça. A primeira cortiça só pode ser extraída do sobreiro quando os troncos atingirem um perímetro de cerca de setenta centímetros quando medido a um metro e meio do chão. A partir de então, a sua exploração durará em média cento e cinquenta anos<sup>5</sup>. No primeiro descortiçamento, a chamada *desbóia*, obtém-se cortiça com uma estrutura muito irregular (com muitos sulcos e fendas verticais, resultante das tensões provocadas pelo aumento do diâmetro do tronco da árvore) e com uma dureza que se torna difícil de trabalhar. É a chamada *cortiça virgem* que será utilizada em outras aplicações que não a produção de rolhas (pavimentos, isolamentos, quadros de cortiça, etc.<sup>6</sup>), pois não apresenta a qualidade necessária para esse fim<sup>5</sup>. No segundo descortiçamento, nove anos depois, obtém-se um material com uma estrutura regular, com menos sulcos e menos duro, mas ainda impróprio para o fabrico de rolhas e que se designa por *cortiça segundeira*<sup>5</sup>. É a partir do terceiro descortiçamento, que se obtém a cortiça com as propriedades adequadas para a produção de rolhas de qualidade, uma vez que já apresenta uma estrutura regular (sem sulcos) e que possui as características estruturais desejadas para a transformação industrial<sup>5</sup>. Esta cortiça é chamada *cortiça amadia ou de reprodução*. O felogene das cortiças amadias produzem grandes quantidades de súber em cada período de crescimento activo anual, só assim atingindo espessuras suficientes para o fabrico de peças maciças, como as rolhas.

Em termos de produção suberícola, o sobreiro necessita de muita luz solar associada a pouca chuva mas a humidade elevada<sup>2</sup>. É na Europa (Portugal, Espanha, França e Itália) e no Norte de África (Argélia, Tunísia e Marrocos) que se reúnem estas características climáticas onde é conseguida a capacidade de regenerar a cortiça após sucessivas extracções<sup>4</sup>.

O sector da cortiça assume uma importância fundamental para a economia nacional. Portugal é o maior produtor e transformador suberícola do mundo representando 75% de toda a cortiça extraída anualmente<sup>2</sup>. Com uma área florestada de sobreiro de 750.000 hectares, Portugal tem vindo a enveredar por uma política de importantes reflorestações. Entre 1993 e 1997 mais de 100.000 hectares foram plantados, correspondendo a um aumento de 16%. O ritmo de reflorestação é, actualmente, de 10.000 hectares/ano<sup>2</sup>.

### 1.1.1 Estrutura Celular da Cortiça

A cortiça é um tecido celular constituído por células prismáticas de paredes finas suberificadas, ocas e fechadas, contendo ar no seu interior. Estas células são mais compridas que largas (30-40  $\mu\text{m}$  e 10-15  $\mu\text{m}$ , respectivamente) e alinham-se em fiadas construindo, no conjunto, uma estrutura tipo favo-de-mel (Figura 2)<sup>7</sup>.



**Figura 2 - Fotografia de microscopia electrónica de varrimento de células de cortiça de reprodução. Corte tangencial evidenciando o arranjo em forma de favo de mel (ampliação de 500 vezes)<sup>8</sup>.**

Essas células são geradas no felogénio e crescem alinhadas formando colunas paralelas à direcção radial da árvore. Na Primavera, o felogénio produz células maiores e de parede celular mais fina do que no Outono. Esta diferenciação celular dá origem às camadas anuais, ou anéis de crescimento que se observam macroscopicamente na cortiça.

É um material leve e elástico, apresentando como característica única a capacidade de ser comprimido sem expansão lateral<sup>9</sup>.

### 1.1.2 Composição Química da Cortiça

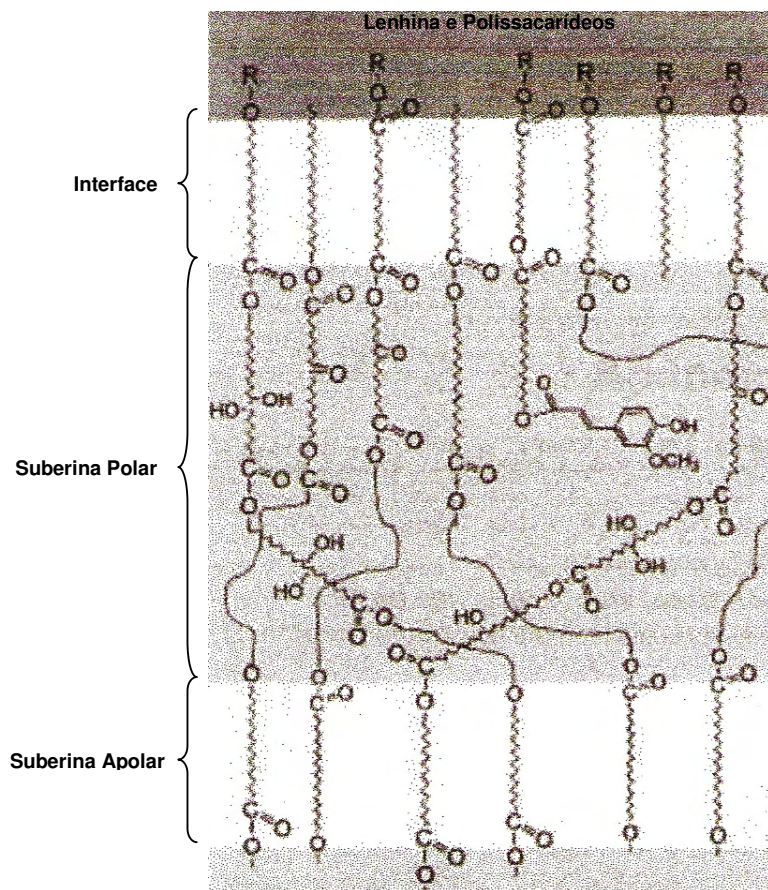
As propriedades únicas da cortiça derivam da sua composição química específica. A suberina é o principal componente das paredes celulares (40%), seguida da lenhina (20%), polissacarídeos (20%), extractáveis (15%) e cinzas (1,2%)<sup>10,11</sup>.

A constituição química das paredes celulares da cortiça pode ser dividida em dois tipos de componentes: os componentes estruturais (suberina, lenhina e polissacarídeos) e os componentes não estruturais (extractáveis). Os componentes estruturais são macromoléculas de natureza polimérica, insolúveis, que conferem às células a sua forma e grande parte das suas propriedades físicas e químicas<sup>1</sup>. Os componentes não estruturais classificam-se em extractáveis e componentes inorgânicos. Os extractáveis são compostos de pequena massa molecular, solúveis e podem ser retirados das células por solubilização com solventes de polaridade adequada, sem alteração significativa das propriedades mecânicas da cortiça<sup>1</sup>.

A suberina é maioritariamente encontrada nas paredes celulares dos tecidos de plantas aéreas ou subterrâneas onde desempenha um papel fundamental como barreira protectora entre o organismo e o meio ambiente<sup>12,13,14,15</sup>. Em plantas superiores, a suberina, organizada numa estrutura lamelar característica, é um dos componentes principais das paredes celulares da camada externa<sup>16</sup>. A suberina é o principal componente das paredes celulares da cortiça e, dadas

as suas funções estruturais, não é possível removê-la sem destruir de forma irreversível a estrutura celular e a organização das paredes.

A suberina consiste num poliéster reticulado, composto por cadeias alifáticas e aromáticas ligadas covalentemente a uma matriz fenólica<sup>17</sup> (Figura 3).



**Figura 3 – Modelo proposto para a estrutura celular da cortiça<sup>18</sup>.**

**Detalhe da parede celular, evidenciando a organização macromolecular da suberina em camadas e a sua ligação à lenhina e polissacarídeos.**

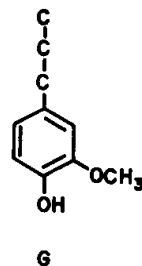
Recorrendo à despolimerização por hidrólise ou metanólise alcalina, seguida da análise dos monómeros por GC-MS, a suberina da cortiça apresenta-se como uma mistura complexa de monómeros, na sua grande maioria alifáticos. Estes compostos são constituídos principalmente por ácidos de cadeia longa, não ramificada, podendo conter uma ligação dupla, grupos hidroxilo ou anéis epóxido no meio da cadeia<sup>1</sup>. Os monómeros encontrados na suberina da cortiça podem agrupar-se em ácidos gordos, álcoois gordos e glicerol. São acompanhados por alguns compostos fenólicos, principalmente ácido ferúlico<sup>1,18,19,20</sup>. Os ácidos gordos incluem uma série de famílias

com diferentes grupos funcionais, que se dividem em três classes: monoácidos,  $\alpha,\omega$ -diácidos (compostos com dois grupos ácidos, um em cada extremidade da cadeia)<sup>12,21</sup> e  $\omega$ -hidroxiácidos compostos com um grupo álcool numa extremidade da cadeia e um grupo ácido na outra)<sup>12,21</sup>, podendo estes dois últimos apresentar insaturação ou outros grupos funcionais a meio da cadeia carbonada, nomeadamente dois hidroxilos vicinais ou um grupo epóxido<sup>1,22,23,24,25,26,27</sup>. Variações na proporção relativa destes monómeros na composição da suberina poderão significar diferenças na estrutura da suberina e eventualmente nas propriedades do material cortiça no seu todo<sup>21</sup>.

A natureza polimérica do biopoliéster foi igualmente evidenciada através do isolamento da suberina por via enzimática<sup>17</sup>. É também conhecida a existência, na suberina da cortiça, de uma fracção alifática de elevada massa molecular (750-1500 Da), não hidrolisável ou trans-esterificável em meio fortemente alcalino<sup>18,28</sup>. Uma fracção significativa da suberina extraída da cortiça por metanólise alcalina apresentou carácter cristalino<sup>29</sup>. Com a utilização de NMR de sólidos, evidencia-se que a suberina nas paredes celulares está espacialmente segregada da matriz de lenhina e polissacarídeos, ligando-se, no entanto, covalentemente, a estas duas famílias de macromoléculas (Figura 3)<sup>17, 18,19,28,29,30,31</sup>. No espaço ocupado pela suberina foi também possível distinguir zonas de elevada organização molecular, de carácter apolar, constituídas por cadeias alifáticas, alternando com zonas desorganizadas, mais polares, compostas por estruturas alifáticas esterificadas com ácido ferúlico (Figura 3).

A lenhina é um polímero de carácter aromático que constitui o segundo componente estrutural mais importante das paredes celulares da cortiça. É insolúvel em água e a sua arquitectura assim como a complexidade química dificultam o seu isolamento. Surge associada à celulose na parede celular apresentando como funções a de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais<sup>32</sup>. A lenhina da cortiça é amorfa, sem uma estrutura supramolecular organizada e aproxima-se de um agrupamento esférico, mais ou menos isotrópico<sup>1</sup>. Como consequência da sua estrutura, a lenhina é dura e rígida; como possui poucos grupos com carácter hidrofílico, a absorção de humidade é baixa.

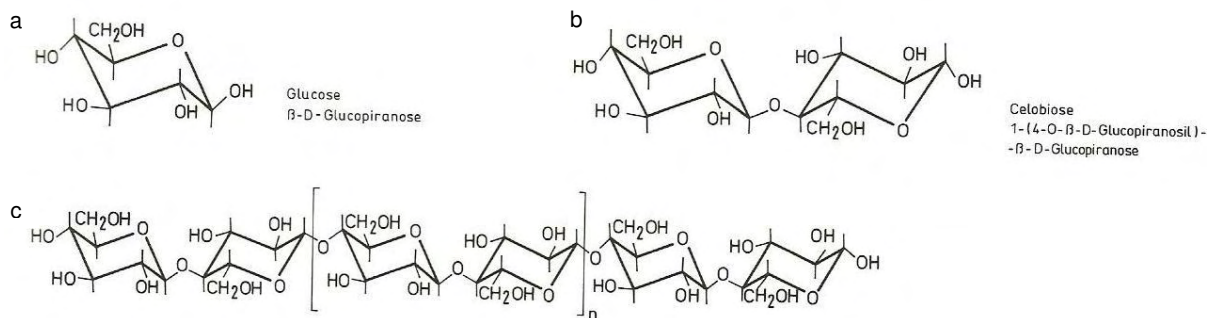
A lenhina isolada da cortiça foi caracterizada estruturalmente para determinar os tipos de ligações intermonoméricas, o que permitiu obter informação sobre a sua estrutura. É constituída essencialmente por unidades derivadas do guaiacilpropano<sup>31,27</sup> (Figura 4) (contrariamente ao que seria de esperar de uma folhosa, onde tipicamente, as lenhinas são constituídas maioritariamente por unidades derivadas do seringilpropano) e apresenta um elevado grau de condensação (entrecruzamento)<sup>18</sup>. Apresenta-se também interligada, com ligações covalentes, com a suberina e com as hemiceluloses<sup>1,31</sup>.



**Figura 4 – Unidade básica C<sub>9</sub> da lenhina da cortiça: Guaiacilpropano<sup>32</sup>**

Os polissacarídeos estruturais das paredes celulares da cortiça são constituídos por celulose e hemiceluloses, polímeros em que as unidades monoméricas são monossacarídeos, pentoses e hexoses<sup>1</sup>. Os monómeros principais são a glucose, a xilose, a manose, a galactose, a arabinose, o ácido 4-*O*- metilglucurónico e a ramnose.

A celulose é uma macromolécula linear constituída por unidades β- D- glucopirranose ligadas entre si por ligações glicosídicas, formando unidades de celobiose, e que se organiza como uma longa cadeia com vários milhares de unidades de glucose (Figura 5)<sup>1</sup>. As moléculas de celulose dispõem-se lado a lado, de uma forma compactada e organizada com ligações de hidrogénio intramoleculares (entre monómeros adjacentes), e unidas entre si por ligações de hidrogénio intermoleculares. A estrutura é maioritariamente cristalina, formando agregados orientados, designados por microfibrilas<sup>1</sup>.



**Figura 5 - Estrutura da glucose (a) e da ligação glicosídica β(1-4) entre duas moléculas de glucose formando a celobiose (b); estrutura da celulose (c).**

As hemiceluloses são heteropolímeros que incluem como monómeros diferentes monossacarídeos, quer pentoses (xilose, arabinose) quer hexoses (glucose, manose, galactose, ramnose, ácido glucurónico), por vezes com grupos substituintes (por exemplo, metilo ou acetilo).

As hemiceluloses diferenciam-se da celulose, para além da constituição monomérica, também por possuírem um menor grau de polimerização e uma estrutura linear ramificada<sup>1</sup>.

Os extractáveis, componentes orgânicos não estruturais da parede celular, ocorrem em percentagens elevadas nas cascas das plantas. Os extractáveis da cortiça incluem muitas famílias de compostos: n-alcanos, n-alcanóis, ceras, triterpenos, ácidos gordos, glicerídeos, esteróis, fenóis e polifenóis. Normalmente, classificam-se em dois grupos: um constituído por lípidos, solubilizados por solventes de baixa polaridade como, por exemplo, o diclorometano; outro constituído por compostos fenólicos extraídos com solventes polares como, por exemplo, o álcool e a água<sup>1</sup>. Os lípidos representam cerca de um terço do total dos extractáveis. Os principais componentes são triterpenos (cerina, friedelina, betulina e ácido betulínico)<sup>2,33,34,35</sup>, que correspondem a cerca de metade dos lípidos extraídos. Incluem-se ainda os n-alcanos, os n-alcanóis, assim como os monoácidos, diácidos e hidroxiácidos suberínicos. Também foi detectada a presença de esteróis.

Os compostos fenólicos extraídos com etanol e água incluem compostos fenólicos simples (fenóis, ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos) e principalmente poliméricos (taninos)<sup>36</sup>. Os ácidos fenólicos são os polifenóis de baixo peso molecular mais abundantes na cortiça<sup>37,38</sup>. Considerando os valores médios globais, o componente maioritário deste grupo é o ácido elágico, seguido, por ordem decrescente de abundância, pelo ácido 3,4-dihidroxibenzoico, o ácido vanílico e o ácido gálico; os ácidos cinâmicos (ferúlico e cafeico) apresentam-se em concentrações mais baixas<sup>37</sup>. Os aldeídos cinâmicos e benzóicos, e as cumarinas são os componentes minoritários<sup>37</sup>.

Com respeito à composição tanínica da cortiça *Quercus suber* pode dividir-se em dois grupos: os taninos hidrolisáveis e as proantocianidinas (designação que até alguns anos era dada aos taninos condensados). Os primeiros são normalmente constituídos por ésteres do ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) e outros compostos cíclicos (ácido hexahidroxidifénico). Subdividem-se ainda em galotaninos ou elagitaninos<sup>39</sup>, sendo este último o grupo que apresenta os níveis mais elevados na componente polifenólica<sup>40</sup>. As proantocianidinas têm como principais componentes as catequinas e as leucoantocianidinas<sup>39</sup>, sendo as principais responsáveis pelas sensações gustativas dos vinhos, nomeadamente ao nível da adstringência.

Os componentes inorgânicos são englobados no que geralmente se denomina por cinzas<sup>1</sup>. Ou seja, o resíduo da combustão completa da matéria orgânica, sendo constituídos principalmente por cálcio (60% m/m das cinzas), seguindo-se o fósforo, o sódio, o potássio e o magnésio<sup>1,9</sup>.

### 1.1.2.1 Fracção Volátil

A composição volátil da cortiça tem sido pouco estudada. No entanto, vários procedimentos têm sido propostos para a sua determinação, nomeadamente a técnica de GC-MS aliada a processos de destilação-extracção<sup>41</sup> ou a técnicas de headspace dinâmico com adsorção em materiais poliméricos<sup>42</sup>.

A maioria dos compostos voláteis identificados apresenta um aroma característico (descritor de aroma – DA) a partir de uma dada concentração (Limite de percepção sensorial – LPS). Assim, o aroma da cortiça depende do tipo de compostos voláteis presentes e da sua concentração.

Na Tabela 1, são apresentados alguns compostos voláteis detectados na cortiça, agrupados com a respectiva classe química, descritores de aroma e limite de percepção sensorial. Alguns desses compostos são responsáveis pelas propriedades organolépticas do vinho<sup>42,43,44,45,46,47,48,49,50</sup>.

Os terpenóides, da qual fazem parte os triterpenos, foram identificados na fracção dos compostos extractáveis, apresentam um vasto espectro de aromas, sendo a maioria muito agradável<sup>51</sup>.

Os álcoois primários identificados são o 1-butanol, o 1-pentanol, o 1-hexanol, o 1-octanol e o 1-dodecanol; a sua origem parece estar na redução de aldeídos alifáticos.

Relativamente aos ácidos alifáticos, pensa-se que resultam da degradação de compostos ácidos da fracção cerosa dos compostos extractáveis da cortiça<sup>42</sup>, composta por ácidos, diácidos e hidroxiácidos gordos. A degradação dos ácidos gordos (peroxidação lipídica) resulta no aparecimento de ácidos de cadeia mais curta, seguindo-se a redução aos correspondentes compostos carbonílicos alifáticos, aldeídos e cetonas, álcoois e alcanos e alcenos. Estes ácidos apresentam aromas intensos e desagradáveis.

Os principais compostos aromáticos presentes na cortiça são os alquilbenzenos. A fonte mais provável para o seu aparecimento é a degradação da lenhina e da componente polifenólica da suberina. A descarboxilação e oxidação da lenhina produzem ácido vanílico e a sua subsequente degradação leva à formação do guaiacol<sup>52</sup> com um aroma a fumo.

Relativamente aos furanos, foram identificados o furfural, o 5-metilfurfural e o álcool furfurílico. A presença destes compostos está normalmente relacionada com a ocorrência de reacções de degradação de açúcares (tipo reacção Maillard). O seu LPS é elevado, sendo por isso fraca a sua contribuição para o aroma da cortiça<sup>42</sup>.

**Tabela 1 - Compostos voláteis identificados na cortiça e respectivos descritores de aroma e limites de percepção sensorial<sup>9</sup>**

Classe química	Composto	Descritor de aroma	LPS em vinho ou *água <sup>19</sup>
Terpenóides	Borneol	Pimenta	-
	Isoborneol	Cânfora	-
	Limoneno	Frutado	60 µg/L *
	Linalol	Floral	100 µg/L *
	α-Terpeniol	Floral	280 µg/L *
Álcoois alifáticos	1-Butanol	Farmacêutico	5 mg/L
	1-Hexanol	Herbáceo	5 mg/L
	3-Metil-1-butanol	Whisky, malte	300 mg/L
	1-Octanol	Cera, sabão	-
Ácidos alifáticos	Ácido 3-metilbutanóico	Ranço	700 µg/L
	Ácido octanóico	Cera, farmacêutico	15 mg/L
Compostos aromáticos	Acetofenona	Floral	-
	Álcool benzílico	Frutado	50 mg/L
	Benzaldeído	Amêndoa amarga	3 mg/L
	Guaiacol	Fumado, madeira	20 µg/L
	Vanilina	Baunilha	100 µg/L *
Furanos	Álcool furfurílico	Feno	52 mg/L
	Furfural	Caramelo	65 mg/L
	5-Metilfurfural	Tostado, amêndoa	35 mg/L
Compostos carbonílicos alifáticos	Decanal	Mofo, marinho, pepino	-
	Hexanal	Verde, erva	4,5 mg/L
	2-Nonenal	Metálico, oleoso, gerânio	-
	2-Undecanona	Rosa, citrino	-
Outros	Benzotiazole	Borracha	-

## 1.2 Da Cortiça à Rolha

A indústria de cortiça possui uma gama completa de rolhas, disponíveis em inúmeros calibres e formatos, de forma a adaptarem-se à enorme diversidade de garrafas e a todo o tipo de vinho. As rolhas de cortiça podem agrupar-se nas seguintes categorias: naturais, champanhe, técnicas, aglomeradas ou capsuladas (Figura 6).





**Figura 6 - Tipos de rolhas produzidas pela indústria da cortiça**

### **1.2.1 Fabricação de Rolhas de Cortiça Natural**

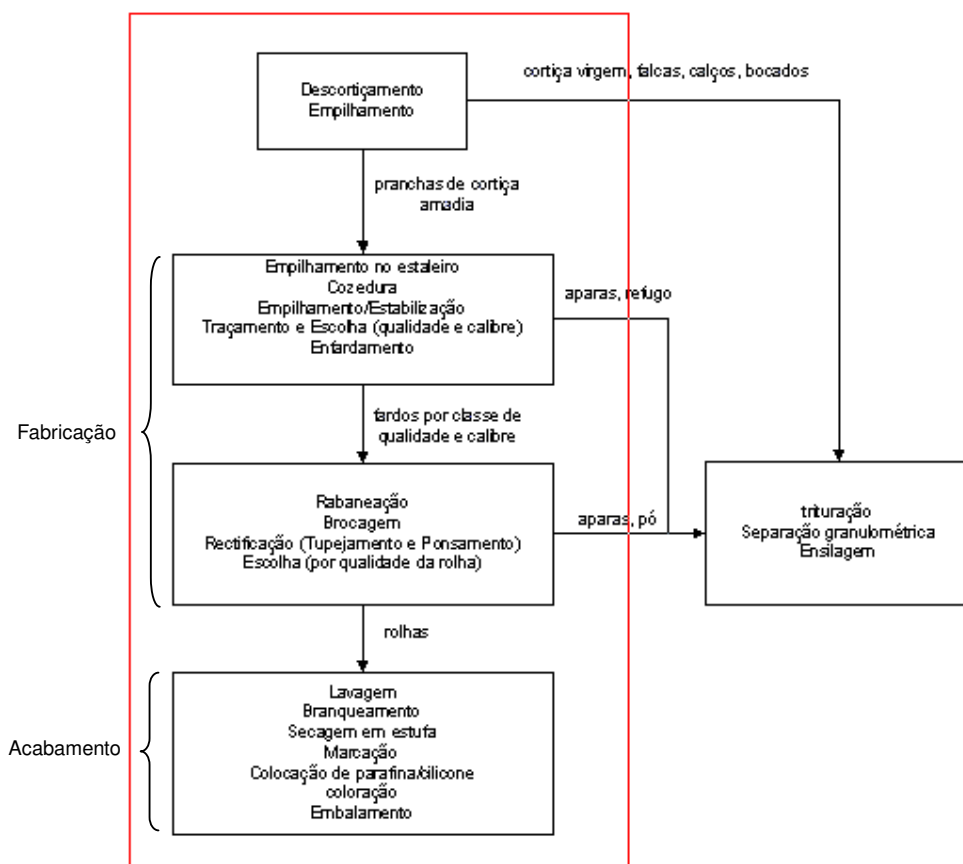
Após o descortiçamento do sobreiro, as pranchas de cortiça são empilhadas na floresta, e em estaleiros dentro das instalações de uma fábrica. Aí permanecem expostas ao ar livre onde se dá a maturação da matéria-prima e a estabilização da cortiça<sup>5,53</sup>. Seguidamente, dá-se início ao processo de fabricação, isto é, o conjunto das operações que transformam a matéria-prima, cortiça, no produto final, rolhas de cortiça (Figura 7).

A primeira etapa é a cozedura das pranchas. É o processo de imersão das pranchas de cortiça em água limpa e a ferver com o objectivo de limpar a cortiça, extrair-lhe as substâncias hidro-solúveis, aumentar a sua espessura e melhorar a sua maleabilidade e elasticidade. Como resultado, a estrutura da cortiça torna-se mais regular e o seu volume aumenta em cerca de 20 por cento. A cozedura é uma operação que, além de melhorar a estrutura interna da cortiça, também contribui para que a microflora seja substancialmente reduzida<sup>5,53</sup>.

Após a cozedura, decorre a estabilização da cortiça. Só depois deste período, que se estende por duas a três semanas, é que se procede à selecção das pranchas. A estabilização serve para aplanar as pranchas e permitir o seu repouso. Assim a cortiça adquire uma consistência e um teor de humidade homogéneo, que permite a sua transformação em rolhas<sup>5,53</sup>.

Depois do período da estabilização, segue-se uma operação manual ou mecânica que consiste no corte das pranchas de cortiça em tiras, ou *rabanadas*, com uma largura ligeiramente superior ao comprimento da rolha a fabricar (processo chamado de *rabaneação*)<sup>5,53</sup>. A espessura da rabanada vai condicionar o diâmetro das rolhas.

A brocagem designa o processo manual ou semi-automático que consiste em perfurar as tiras de cortiça com uma broca. Obtém-se assim, uma rolha cilíndrica, sem deformação e em conformidade com os limites dimensionais desejados<sup>5,53</sup>.



**Figura 7 - Esquema do Processo Produtivo da Rolha Natural<sup>54</sup>**

Após a brocagem, tem-se a etapa de rectificação. Este processo consiste em operações mecânicas de polimento dos topos (topear) e/ou do corpo das rolhas (ponçar), serve para assegurar as dimensões finais previamente especificadas e para regularizar a superfície da rolha<sup>5,53</sup>.

Depois da rectificação, vem a etapa de selecção, vulgarmente designada por escolha, é a operação destinada a separar as rolhas acabadas em classes diferenciadas, sendo que a determinação de cada classe é feita por controlo automático da superfície das rolhas. Em alguns casos, a selecção é feita por escolha visual por operários experimentados<sup>55</sup>. Durante esta fase, além de serem definidas as qualidades das rolhas, são também eliminadas as rolhas com defeitos<sup>5,53</sup>.

O acabamento das rolhas de cortiça consiste num conjunto de operações que transformam as rolhas em bruto em rolhas prontas a utilizar.

Após a rectificação, procede-se à lavagem das rolhas. Este banho serve para limpar e desinfetar as rolhas. Depois da lavagem/desinfecção, o teor de humidade é estabilizado, obtendo-se assim uma optimização da performance da rolha como vedante e reduzindo, em simultâneo, a contaminação microbiológica.

Seguidamente pode ter-se uma etapa de marcação ou *branding*. Esta operação é realizada de acordo com as indicações do cliente para o tipo de marca a aplicar. Como modo de impressão existe a impressão a tinta (de qualidade alimentar) ou a marcação a fogo.

Depois da marcação, trata-se a superfície da rolha com parafina e silicone para facilitar quer a sua introdução na garrafa, quer a sua posterior extracção pelo consumidor final.

Quando finalizada a produção, as rolhas são embaladas em sacos de plástico repletos de SO<sub>2</sub> (anidrido sulfuroso), um gás inibidor do desenvolvimento microbiológico. Só então serão transportadas até ao engarrafador de vinhos ou de bebidas espirituosas.

### **1.3 Potenciais Parâmetros de Qualidade de Rolhas de Cortiça Natural**

#### **1.3.1 Padrão Visual – Qualidade Visual**

A classe visual das rolhas depende principalmente da quantidade, tamanho e distribuição dos poros (lenticelas) que a sua superfície apresenta<sup>56,57</sup>. Naturalmente que, quanto menos e de menor dimensão forem os poros, melhor será a qualidade da rolha, maior será o seu interesse industrial e maior o seu valor.

Na classificação generalizada da indústria corticeira é frequente encontrar as classes definidas com os seguintes nomes, segundo critérios visuais (ordem decrescente de qualidade): Flôr, Extra, Superior, 1º, 2º, 3º, 4º e 5º<sup>58</sup>. Na prática comercial é também frequente agrupar classes de qualidade constituindo lotes mistos: por exemplo 4º/5º<sup>51</sup>.

A classificação, sendo um parâmetro subjectivo, faz-se com base numa amostra de várias rolhas (varia de produtor para produtor) com intervalos de variabilidade aceites<sup>58</sup>. A classificação de rolhas de acordo com as suas características visuais tem sido importante para a venda de rolhas. Tem havido um acordo tácito entre Vendedores e Compradores em que as características visuais da cortiça, e num nível inferior o comprimento da rolha, se relacionam com o desempenho global da rolha, apesar de não haver evidência científica que suporte esta relação. Como resultado, o preço das rolhas é principalmente determinado pela sua classe visual e comprimento.

Nos inúmeros estudos envolvendo rolhas de cortiça, é notável o esforço que tem sido realizado na caracterização da cortiça, nomeadamente no que diz respeito à presença e extensão dos canais lenticulares. Dada a variabilidade encontrada na porosidade da rolha, é de notar que esta pode contribuir para a variação dos resultados encontrados para o comportamento das rolhas de cortiça. Uma vez que o material de preenchimento lenticular e a cortiça têm diferentes estruturas e composição química é natural que se comportem de modos diferentes relativamente à absorção e permeação do 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) e de outros compostos<sup>59</sup>.

### 1.3.2 Dimensões – Calibre

Toda a produção de cortiça amadia em prancha é dirigida para o fabrico de rolhas desde que apresente espessura e qualidade consideradas adequadas. Relativamente à espessura, excluem-se as pranchas de calibre inferior à meia-marca (27 mm), por não permitirem fisicamente a brocagem de rolhas com as dimensões usuais, e as pranchas grossas com calibre superior a 54 mm, porque apresentam características mecânicas consideradas desadequadas para o funcionamento da rolha (principalmente uma menor resistência à compressão) e, frequentemente, também muitas descontinuidades<sup>1</sup>.

O calibre traduz a espessura da prancha de cortiça, a qual é medida em “linhas” (1 linha = 2,26 mm). A cortiça com 9 anos de crescimento tem normalmente entre 6 e 24 linhas (13,54 a 54,14 mm). As classes de calibre são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2 - Classificação das Pranchas de Cortiça de acordo com o Calibre<sup>58</sup>**

Designação	Linhas <sup>(1)</sup>	Milímetros (mm)
Delgadinha	6	13,54
	8	18,05
	9	20,30
Delgada	10	22,56
	11	24,82
Meia Marca	12	27,07
	13	29,33
Marca	14	31,58
	15	33,84
	17	38,85
Grossa	18	40,61
	20	45,12
	22	49,63
Triângulo	>24	54,14

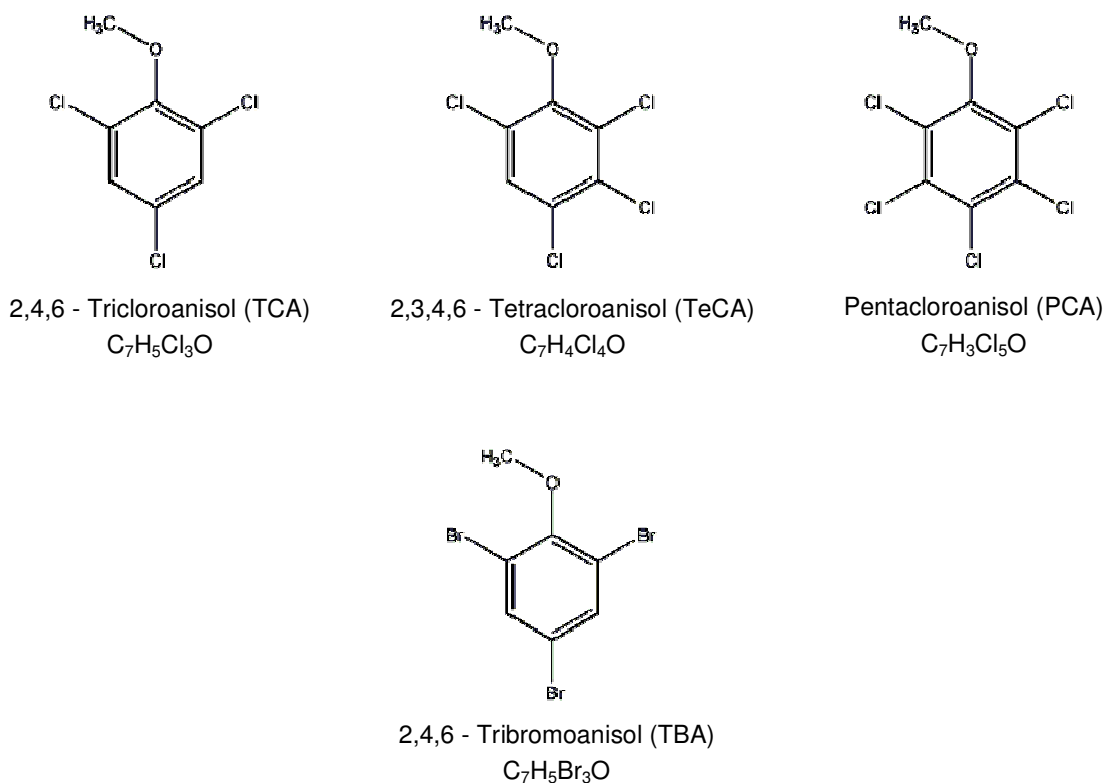
### 1.3.3 Fornecedores

A indústria nacional corticeira inclui perto de 1100 empresas registadas que empregam mais de 15000 pessoas. A maior parte são empresas de pequena e média dimensão, com um número de trabalhadores inferior a 20. A classificação das indústrias é feita por tipo de actividade, considerando-se, por norma, a seguinte divisão: indústria de preparação, indústria rolheira, indústria granuladora e indústria aglomeradora<sup>1</sup>. Em muitos casos, as unidades industriais podem englobar mais do que uma destas actividades, por exemplo a granulação e a aglomeração. Outra

associação frequente é a da preparação da cortiça com a produção de rolhas ou de discos, possuindo praticamente todas as unidades corticeiras de média e grande dimensão a capacidade interna de cozedura e preparação de pranchas<sup>1</sup>.

#### 1.4 O 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) nas rolhas de cortiça

O haloanisol mais conhecido por representar um problema de grande importância na indústria corticeira e vitivinícola é o 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA). Outros têm sido também referenciados, o 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o 2,4,6-tribromoanisol (2,4,6-TBA) (Figura 8).



**Figura 8 - Estrutura e fórmula química de compostos susceptíveis de provocar defeitos em vinhos, associados à cortiça**

Estruturalmente são compostos derivados do anisol (metoxibenzeno) e incluem na sua composição um ou mais átomos de um halogéneo. O anisol é um composto que está presente num grande número de substâncias voláteis que podem ser muito odoríferas. O odor destes compostos é muitas vezes percebido como mofo, bolor ou bafio modificando o aroma natural do vinho e diminuindo, assim, a sua qualidade.

O TCA é considerado o principal responsável por pelo menos 80% dos casos de defeitos em vinhos<sup>60</sup>. Possui um limite de percepção sensorial olfactivo em solução alcoólica muito baixo (1,5 - 3 ng/L<sup>61</sup>) e uma capacidade considerável para migrar de rolhas contaminadas para o vinho com o qual está em contacto ainda que em extensões variáveis, por exemplo 0,6-25%<sup>46,62</sup>.

O TCA é um composto não polar com grande afinidade para os lípidos tais como os que são encontrados na cortiça (extractáveis monoméricos e suberina polimérica) ou nas cutículas das plantas. Forma-se por uma reacção de biometilação do 2,4,6-Triclorofenol (TCP) mediada por diferentes espécies microbiológicas<sup>63,64,65</sup>. A presença do TCP e consequentemente do TCA na cortiça pode ter várias causas: o uso de biocidas fenólicos policlorados nas florestas, nas paletes de madeira, no material de embalagem e contentores e contaminações ambientais nas próprias caves. A contaminação nas caves pode ocorrer durante o manuseamento e armazenamento de materiais assim como durante o engarrafamento do vinho. Sendo assim, as fontes de contaminação devem ser eliminadas e as fontes microbiológicas investigadas pelas indústrias corticeira e vitivinícola. É necessário um manuseamento adequado das rolhas de cortiça devido à capacidade de absorver o TCA assim como outros cloroanisóis nomeadamente a partir do vinho<sup>66</sup> ou do meio ambiente<sup>67</sup>.

A indústria corticeira tem adoptado medidas para prevenir o TCA e os compostos que o podem originar direccionando-se em três vertentes: a) prevenir a contaminação da cortiça por compostos clorados; b) evitar o desenvolvimento microbiano na cortiça; e c) introduzir práticas correctivas aquando da contaminação por TCA.

No que diz respeito à matéria-prima cortiça, as pranchas são escolhidas antes do seu processamento de modo a eliminar aquelas que possuem sinais de actividade microbiana (como mancha amarela). Também a parte da cortiça formada na base do tronco, em contacto directo com o solo é cortada e eliminada uma vez que se sabe que potenciais contaminações com TCP ou TCA são mais prováveis nesta parte<sup>59</sup>. A procura da mancha amarela assim como evidências de ataques microbianos continuam pela linha de produção. As pranchas contaminadas não podem ser usadas para a fabricação de rolhas, discos ou para trituração para obtenção de produtos para rolhas aglomeradas. Também o armazenamento das pranchas de cortiça antes da produção deve obedecer a determinadas regras: não podem estar em contacto directo com o solo e toda a área industrial deve se cimentada ou possuir uma camada protectora plástica entre as pilhas de cortiça e o solo.

A contaminação microbiana durante o processamento industrial é reduzida por diminuição do tempo de armazenamento e controlo das condições de armazenamento entre a cozedura das

pranchas de cortiça e o seu processamento em rolhas. O longo período de secagem entre a cozedura e o processamento das pranchas em ambientes fechados e húmidos com um forte desenvolvimento microbiano de várias espécies de fungos na costa da cortiça das pranchas, como era costume a alguns anos atrás, caiu em desuso.

Actualmente, as fábricas de cortiça não usam compostos halogenados ao longo de todo o processo de fabricação de rolhas. A mudança consistiu na substituição dos produtos clorados usados nas lavações por peróxido de hidrogénio, conseguindo eliminar uma eventual cloração de substâncias fenólicas presentes na cortiça (lenhina e extractáveis). Isto significa que a principal razão para a presença do TCA nos vinhos, citada na grande maioria das publicações, como sendo a lavagem da cortiça com soluções que continham cloro, deixa de fazer sentido uma vez que esses procedimentos não são mais aplicados com as actuais condições industriais.

### 1.5 O TCA nos vinhos

O vinho consiste numa solução quimicamente complexa suportada numa matéria-prima biologicamente natural (uvas), em transformações bioquímicas mediadas por microorganismos (fermentação) e numa evolução ao longo do tempo também através de reacções químicas e bioquímicas que contribuem para formação do sabor e aroma do vinho<sup>1</sup>. Como consequência, o vinho não pode ser completamente caracterizado apenas por dados analíticos e a avaliação sensorial é fundamental, a variabilidade é também uma característica intrínseca dos vinhos.

A última avaliação de um vinho é feita pelo consumidor através do sabor e do aroma na altura de abrir a garrafa e consumir. Ocasionalmente aparecem odores e sabores desagradáveis que em último caso podem tornar o vinho intragável. Um dos defeitos mais importantes no vinho é sabor ou odor a mofo ou bafio devido à presença de haloanisóis nomeadamente o TCA. Tradicionalmente este defeito é denominado de *gosto a rolha*<sup>55</sup>. No sentido de clarificar o significado do *gosto a rolha*, afastando desta classificação desvios organolépticos que podem ter uma origem distinta como por exemplo acidentes de natureza enológica, ou de contaminação da rolha por compostos de aroma nos locais de armazenamento do vinho<sup>55</sup>, e por outro lado normalizar a terminologia utilizada nos descritores de aroma, foi elaborada uma roda de aromas da cortiça<sup>9</sup> (Tabela 3). De acordo com a roda de aromas da cortiça, os descritores de aromas foram agrupados em famílias, que originaram cinco grupos principais de desvios organolépticos (*off flavors*) encontrados no vinho e passíveis de serem transmitidos pela rolha: musgo, químico, vegetal, conífero e bolor. Esta definição permite distinguir os falsos *gostos a rolha*, e constituir assim um índice rigoroso de classificação homogénea para o auxílio de todos os provadores<sup>55</sup>.

**Tabela 3- Roda dos aromas da cortiça<sup>68</sup>**

Grupo	Família	Descritor de Aroma
Musgo	Cogumelo fresco	Cogumelo; Trufa
	Húmus	Pútrido/Cogumelos
	Terroso	Cortiça húmida; Terra fresca; Beterraba vermelha; Batata
Químico	Sulfureto	Choco; Pútrido; Pêlo molhado; Lã molhada
	Pirogénico	Alcatrão; Borracha queimada; Cinza
	Fenólico	Farmacêutico; Couro; Fumo
	Hidrocarbonetos	Petróleo; Gasóleo; Gasolina
Vegetal	Madeira	Cortiça fresca; Madeira; Poeira
	Herbáceos	Erva; Feijão verde; Madeira verde
	Balsâmico	Caramelo; Baunilha; Feno
	Especiarias	Aromático; Pimenta; Paprika
Conífero	Agressivo	Cânfora; Eucalipto
	Terpénico	Pinheiro; Resina
Bolor	Bolorento	Bolor; Bafio; Pútrido (frutos); Mofo de cortiça; Mofo de cave

A extensão da incidência do TCA em vinhos engarrafados é um assunto com pouca informação bibliográfica credível aparecendo valores desde 1% até perto de 10%. Um estudo recente sobre uma considerável amostra de vinhos comerciais originários de diferentes países e com diferentes vedantes nas garrafas mostraram uma incidência de defeitos no vinho de 6%<sup>75</sup>. Em alguns casos de vinhos com defeito a quantidade de TCA não é suficiente para explicar a sua presença, por exemplo, numa amostra de garrafas de vinho classificadas por um painel de provadores como com defeito, apenas 27% continham TCA em concentrações acima dos 2ng/L<sup>75</sup>.

### 1.6 A Micro-extracção em Fase Sólida (SPME)

Vários procedimentos têm sido propostos para a detecção e quantificação do TCA técnicas como extracção líquido-líquido<sup>69,70,71,72</sup>, extracção em fase sólida<sup>73,74,75</sup>, microextracção em fase sólida<sup>49,52,76</sup>, extracção sorptiva em barra de agitação<sup>77,78</sup>, espaço de cabeça dinâmico<sup>79,80</sup> e extracção por fluidos super-críticos<sup>81</sup> têm sido amplamente utilizadas.

A formação de anisóis e tioanisóis por metilação de fenóis halogenados e tiofenóis já foi referido em algumas espécies de *Rhodococcus*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*<sup>63,65</sup>.



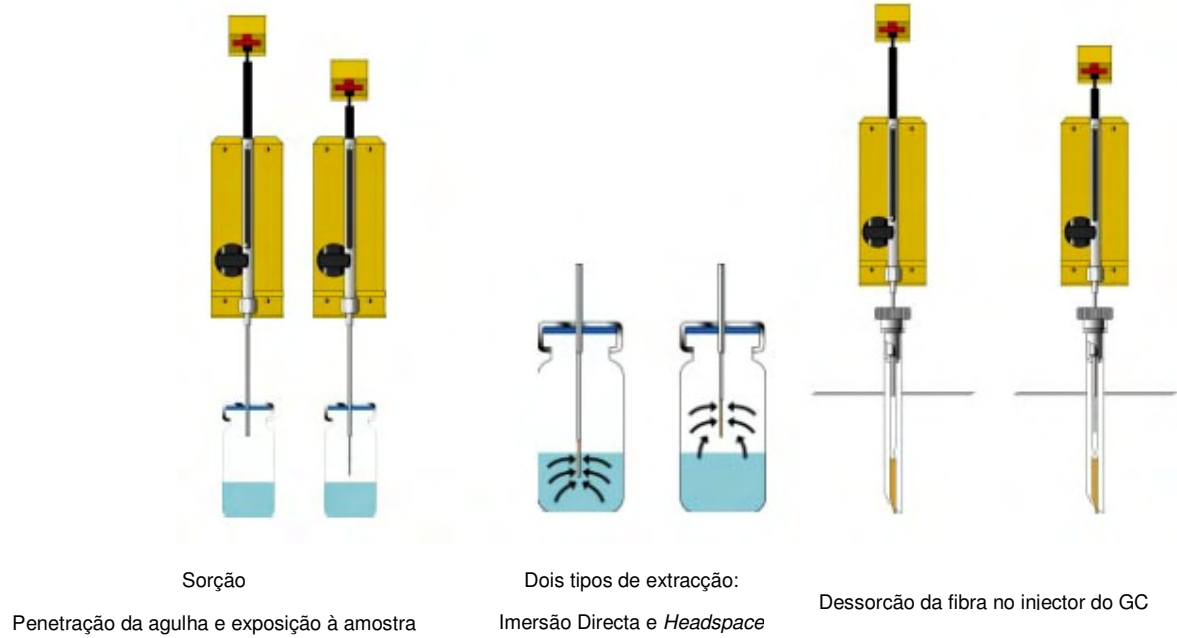
Espécies de fungos como *Penicillium* (4 estirpes), *Trichoderma* (2 estirpes), *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces* e *Verticillium* presentes em amostras de cortiça, são responsáveis pelo aparecimento do TCA<sup>82</sup>. Onze dessas espécies podem produzir TCA ao crescerem directamente na cortiça e na presença de triclorofenol (TCP) como precursor<sup>82</sup>. Os níveis mais elevados de conversão foram conseguidos pelas espécies *Trichoderma* e *Fusarium* pela transformação de 25% do precursor em TCA<sup>82</sup>. A espécie *Trichoderma longibrachiatum* conseguia eficientemente produzir TCA em meios líquidos<sup>82</sup>. No entanto, foi evidente a ausência de níveis significativos deste composto em culturas desenvolvidas na cortiça aquando da presença de supostos precursores como TCP, anisóis, fenóis, diclorofenóis, triclorofenóis ou outros compostos clorados complexos<sup>82</sup>.

A Micro-Extracção em Fase Sólida (SPME) foi desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores em 1990<sup>83,84</sup>. É uma técnica de extracção e pré-concentração que surgiu como uma alternativa aos métodos tradicionais de extracção em espaço de cabeça dinâmico, extracção líquido-líquido e outras técnicas de extracção<sup>83</sup>. Envolve a exposição de uma fase estacionária à amostra e a partição de analitos entre fases. Posteriormente são termicamente desorvidos no injector de um instrumento analítico (Figura 9).

A técnica de SPME tem sido rotineiramente combinada com GC e GC-MS e aplicada, com sucesso, a uma grande variedade de compostos, e especialmente para a extracção de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de ambientes biológicos e amostras alimentares. A técnica de SPME foi também introduzida em HPLC e LC-MS com o intuito de analisar compostos pouco voláteis ou termicamente instáveis que não podem ser tratados por GC ou GC-MS<sup>85,86,87</sup>.

A análise por SPME surge com variadíssimas vantagens: simplicidade de utilização, rapidez, automatização de preparação das amostras, ausência de solventes orgânicos e caracterização do espaço de cabeça da amostra, fornecendo um extracto representativo dos compostos responsáveis pelo aroma que é detectado pelo sistema olfactivo<sup>85,88</sup>.

A técnica de SPME funciona em sistemas de duas fases<sup>89</sup> quando se está na presença de uma amostra gasosa ou de uma amostra líquida que ocupa o volume total do recipiente onde se encontra. As duas fases envolvidas são a fase gasosa ou líquida, dependendo da amostra ser um gás ou um líquido, e a fase estacionária que reveste o suporte sólido utilizado. Quando se trabalha com amostras sólidas ou amostras líquidas que não ocupam a totalidade do volume do recipiente que as contém fala-se de sistemas de 3 fases<sup>90</sup>: uma fase sólida ou líquida, conforme o estado físico da amostra, uma fase gasosa, correspondente ao espaço de cabeça da amostra, e uma fase estacionária referente ao revestimento do suporte sólido adoptado. No caso de sistemas de 3 fases, a análise pode ser efectuada de dois modos distintos: imergindo a fase estacionária na solução a analisar (*Direct Immersion*: DI-SPME) ou colocando-a em contacto com o respectivo espaço de cabeça (*Headspace*: HS-SPME). Assim, a quantidade de analito sorvida na fase estacionária, pode ser relacionada com a concentração de equilíbrio dos analitos nas fases do sistema.



**Figura 9 - Etapas de um ciclo de SPME<sup>91</sup>**

Considerando um sistema de três fases no equilíbrio, a quantidade total de analito acumulada na fase estacionária é igual à quantidade de analito em equilíbrio nas três fases:

$$C_0 V_2 = C_1^\infty V_1 + C_2^\infty V_2 + C_3^\infty V_3 \quad (1)$$

em que  $C_0$  é a concentração inicial do analito na amostra;  $C_1^\infty$ ,  $C_2^\infty$ ,  $C_3^\infty$  são a concentração de equilíbrio do analito na fase estacionária, amostra e espaço de cabeça respectivamente, e  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$  o volume de fase estacionária, solução amostra e espaço de cabeça respectivamente.

Usando o conceito de coeficiente de partição entre fase estacionária e espaço de cabeça

$$K_1 = \frac{C_1^\infty}{C_3^\infty} \quad (2) \text{ e entre espaço de cabeça e amostra } K_2 = \frac{C_3^\infty}{C_2^\infty} \quad (3), \text{ a quantidade de analito}$$

acumulada pela fase estacionária, denominada capacidade do revestimento,  $n = C_1^\infty V_1$  (4), pode ser expresso como:

$$n = \frac{K_1 K_2 V_1 V_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} C_0 \quad (5)$$

Assim, dependendo dos coeficientes de partição entre as fases e dos volumes de cada fase, pode ser traçada uma relação de proporcionalidade entre a concentração inicial do analito na amostra e a quantidade de equilíbrio do analito acumulada na fase estacionária.

Sendo a técnica de SPME baseada na sorção, a amostra sólida ou líquida é colocada num frasco selado com um septo, de seguida a amostra é termostaticada para que os compostos voláteis se libertem desta e passem para o espaço de cabeça, é então estabelecido um equilíbrio entre a fase que contém os componentes voláteis e a fase que contém a amostra<sup>97</sup>. No entanto, nem sempre se trabalha em situação de equilíbrio, sendo importante manter as mesmas condições experimentais para cada ensaio.

### 1.6.1 Fase Estacionária da Técnica de SPME

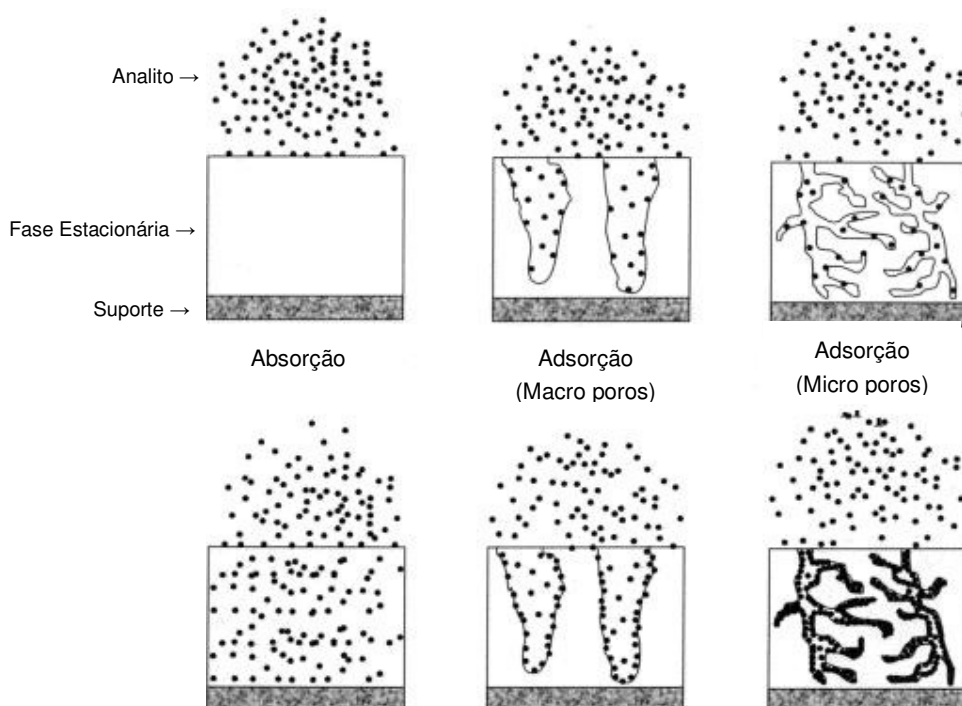
Um dos aspectos críticos na optimização da SPME é a selecção do tipo de fibra específica para os compostos com interesse analítico<sup>92</sup>. Existem vários tipos de fases estacionárias em SPME (Tabela 4) estando a sua escolha dependente, quer da composição da fracção volátil da amostra que se pretende analisar, quer das condições experimentais. Por exemplo, o revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) com 100 µm de espessura de filme é, essencialmente seleccionado para a análise de compostos com características hidrofóbicas<sup>93</sup>. Por outro lado, fibras à base de poliacrilato (PA) têm igualmente surgido no mercado, sendo mais adequadas na extracção de compostos hidrofílicos, devido à maior polaridade do revestimento<sup>92</sup>. Ainda outro tipo de fibras, cobrindo uma vasta gama de revestimentos, espessuras de filme e polaridades, têm sido desenvolvidas e actualmente, encontram-se disponíveis no mercado para as mais diversas aplicações<sup>92</sup>.

**Tabela 4 - Algumas características das fibras de SPME disponíveis comercialmente para amostragem** <sup>85,94</sup>.

Fase Estacionária	Espessura µm	Temperatura (°C) *	Uso recomendado
PDMS	100	200-270	VOCs
	30	200-270	VOCs apolares
	7	220-320	VOCs semi polares
PDMS/DVB	65	200-270	Voláteis polares
	60	200-270	HPLC
CX/PDMS	75	240-300	VOCs vestigiais
CW/DVB	65	200-260	Compostos Polares
StableFlex	50/30	230-270	
DVB/CX/PDMS			
Stable Flex	50/30	230-270	
DVB/CX/PDMS			
CW/TPR	50	-	Compostos polares
PA	85	220-310	VOCs polares

Em SPME, as fibras apresentam como vantagem o facto de poderem ser usadas inúmeras vezes, dependendo no entanto, do tipo de aplicação a que as mesmas são sujeitas, da composição da amostra, das condições experimentais e dos cuidados no respectivo manuseamento<sup>92</sup>.

No que se refere à interacção entre a fase estacionária e os analitos extraídos da amostra, esta pode ser de absorção, adsorção ou mista (Figura 10). Contudo, independentemente da natureza desta interacção, em ambos os casos, o processo de extracção inicia-se com a adsorção dos analitos, na superfície do revestimento das fibras. A migração destes para o interior do revestimento ou a sua permanência na superfície do revestimento depende da magnitude do coeficiente de difusão do analito nesse revestimento<sup>95</sup>, dependendo do tipo de fibra, numa fase posterior, poderá então ocorrer absorção ou adsorção.



**Figura 10 - Esquema representativo dos fenómenos de absorção e adsorção dos analitos pela fase estacionária da fibra de SPME<sup>96</sup>**

Numa fase estacionária absorvente os analitos da amostra são extraídos para o seu interior ficando retidos pela fase estacionária<sup>96</sup>. Neste caso, a capacidade de absorver determinada quantidade de analito, depende principalmente da espessura do filme e do tamanho do analito<sup>96</sup>.

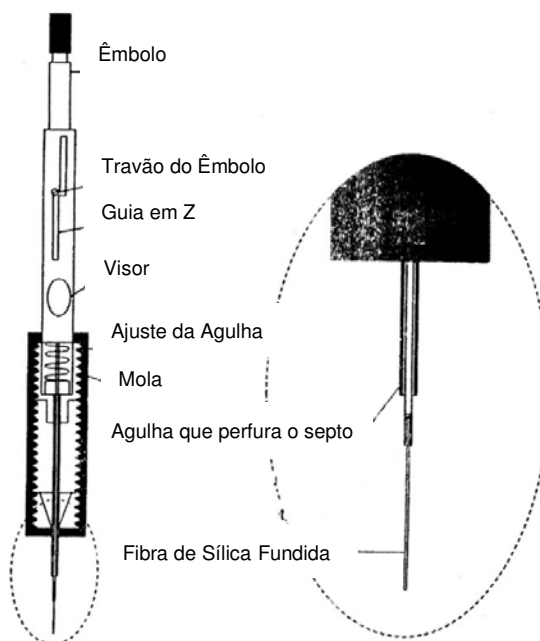
Numa fase estacionária adsorvente, os analitos são retidos à superfície de uma estrutura cristalina que pode apresentar poros de diferentes diâmetros, micro (2-20 Å), meso (20-500 Å) e macro (> 500 Å), havendo deste modo, um número mais limitado de locais de sorção do que nas absorventes, o que pode provocar competição entre os analitos. Para concentrações de analito

muito elevadas as fases estacionárias adsorventes ficam saturadas e a sua resposta deixa de ser linear<sup>96</sup>. Em geral, uma fibra do tipo absorvente tem uma gama de linearidade quatro vezes superior a uma fibra tipo adsorvente<sup>96</sup>.

Quanto à fase estacionária mista (caso da CW/DVB), existe um efeito sinérgico de adsorção e absorção que promove uma capacidade elevada de retenção dos analitos por parte da fase estacionária, tornando-se deste modo, mais sensível que uma fase estacionária absorvente<sup>97</sup>.

O dispositivo mais utilizado na técnica de SPME consiste num tubo metálico onde é colocada uma fibra que lhe confere um aspecto de seringa modificada<sup>98</sup>.

O suporte para a fibra consiste num corpo cilíndrico de aço inoxidável, num êmbolo com uma mola e um guia de agulha ajustável (Figura 11). A fibra de sílica fundida é revestida com uma película relativamente fina de várias fases estacionárias poliméricas. Esta película concentra os analitos orgânicos provenientes da matriz da amostra em estudo, à sua superfície durante os processos de sorção.



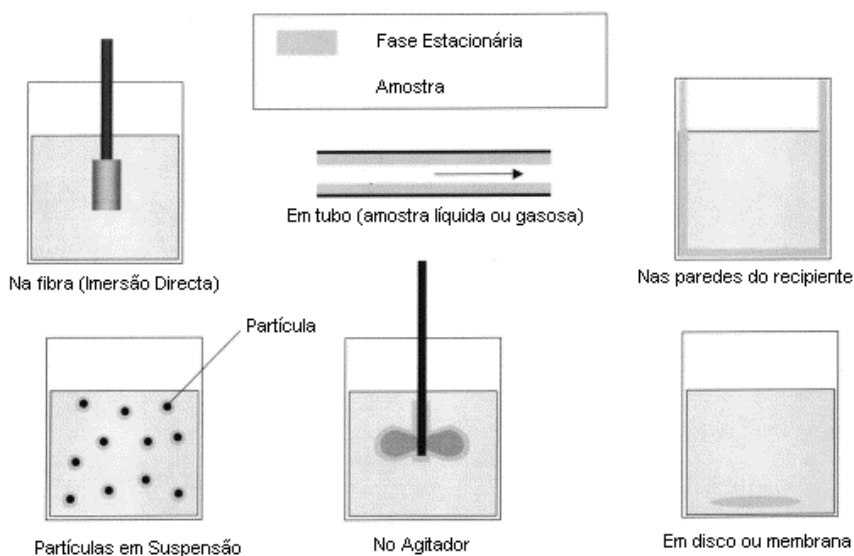
**Figura 11 - Dispositivo Comercial de SPME<sup>98</sup>**

Têm sido desenvolvidas outras configurações para a técnica de SPME: a fase estacionária pode ser colocada nas paredes do recipiente ou num tubo por onde a amostra é passada; na forma de partículas suspensas na solução, como revestimento de um agitador ou sob a forma de disco ou membrana (Figura 12).

Caso a matriz da amostra apresente características muito agressivas, a fase estacionária pode ser protegida com a utilização de uma membrana porosa que impeça o contacto de substâncias sem interesse com a fase estacionária.

A sensibilidade da técnica de SPME é melhorada por uma rigorosa selecção do tipo de fase estacionária e modo de extracção (ID-SPME ou HS-SPME). Sendo assim, para se desenvolverem metodologias de SPME é importante conhecer as características físico-químicas dos analitos (como a polaridade, pressão de vapor, estrutura e massa molecular, grupos funcionais) e os efeitos de matriz<sup>99,100</sup>.

Para assegurar níveis adequados de reprodutibilidade, é importante manter fixos os parâmetros experimentais que influenciam a extracção do analito.



**Figura 12 - Exemplos de disposição de extracção por SPME<sup>96</sup>**

## 1.6.2 Parâmetros que influenciam as condições experimentais

### 1.6.2.1 Na sorção

O equilíbrio de partição dos compostos voláteis entre o espaço de cabeça e a fibra de SPME é influenciado por várias condições experimentais, tais como o efeito do volume, da temperatura de extracção, da agitação, da composição da amostra e do tempo de extracção<sup>101</sup>.

A razão volume de espaço de cabeça / volume da amostra (razão  $\beta$ ), é a razão entre o volume de gás e o volume de amostra, a qual pressupõe que tem de haver espaço suficiente para que os compostos se possam volatilizar para o espaço de cabeça, de forma a conseguir uma boa sorção dos compostos à fibra<sup>90</sup>.

No efeito da temperatura, ocorre o aquecimento da amostra que fornece energia ao sistema e faz com que as moléculas dos analitos ultrapassem as barreiras que os prendem à matriz da amostra. Com o aumento da temperatura, há também, aumento da pressão de vapor, facilitando a passagem dos analitos da fase aquosa para o espaço de cabeça, tornando o processo de transferência mais eficaz<sup>101</sup>.

Relativamente ao efeito da agitação, esta facilita o transporte dos analitos da amostra até à fase estacionária conseguindo tornar a extracção mais uniforme<sup>90</sup>.

No efeito do tempo de extracção, quanto maior o período de extracção, isto é, o contacto da fibra com a matriz da amostra, maior será a quantidade de compostos extraídos até se atingir o equilíbrio<sup>90</sup>. No entanto, isto não é uma situação linear visto que compostos mais voláteis necessitam de menores tempos de sorção do que compostos menos voláteis.

#### 1.6.2.2 Na dessorção

A eficiência da dessorção térmica do analito no injector do GC depende da volatilidade do analito, da espessura do revestimento da fibra, da temperatura do injector e do tempo de exposição, sendo estes os parâmetros a controlar<sup>89</sup>.

De um modo geral, a temperatura óptima de dessorção é aproximadamente igual ao ponto de ebulição do analito menos volátil. Para prevenir o alargamento dos picos, a temperatura inicial da coluna do GC deve ser mantida baixa. Deste modo, consegue-se uma maior concentração de analitos à cabeça da coluna. O tempo de dessorção depende da temperatura do injector.

A utilização de sistemas automáticos de injeção permite um maior controlo das condições de injeção (posição e profundidade da fibra) e o tempo de dessorção, melhorando a reprodutibilidade da metodologia.

### 1.7 Metodologias de SPME para Determinação do TCA em Cortiça e em Vinho

Devido às características da cortiça e da sua utilização, surgiram dois conceitos: TCA total e TCA que potencialmente pode migrar para o vinho<sup>102,103</sup>. Assim, a análise do TCA na cortiça pode ser realizada directamente sobre a cortiça ou após extracção prévia da cortiça com uma matriz líquida simulante de vinho. A análise faz-se sobre a matriz líquida, sendo o resultado definido como TCA libertável (TCA *releasable*). A determinação da quantidade de TCA libertado baseia-se

numa transferência de compostos entre o sólido (rolha) e o líquido (simulante de vinho) depois de submeter as rolhas de cortiça a um período de maceração (24 horas  $\pm$  2 horas).

A primeira publicação para análise do TCA por SPME consistiu numa extracção directamente a partir de pedaços de cortiça<sup>104</sup>, os resultados obtidos apresentaram-se com baixa reprodutibilidade. Em vinho<sup>104,105</sup>, a técnica de SPME apresentava bons resultados ao nível da reprodutibilidade e linearidade, com limites de detecção (entre 0,5 e 2,9 ng/L) inferior ao limite de percepção sensorial (LPS de 4 ng/L).

Na Tabela 5 são apresentadas algumas metodologias de SPME aplicadas à cortiça e ao vinho para análise de compostos voláteis.

**Tabela 5 - Metodologias de SPME aplicadas a vinho e cortiça para análise de TCA e cloroanisóis presentes ou transmitidos pela cortiça**

Ano de Publicação	Matriz	Metodologia		LOD ng/L	Ref.
		Extracção	Análise		
1997	Vinho e Cortiça	SPME, PDMS	GC-MS, Método de Adição padrão	2,9	104
	Vinho	HS-SPME, PDMS	GC-MS, PI: TCA deuterado	0,5-2	105
1999	Macerado de Cortiça	HS-SPME, PDMS	GC-ECD, PI: TCA deuterado	1,5	102
2002	Vinho	HS-SPME, PDMS e DVB/CAR/PDMS	GC-ECD, PI: 2,3,6-Triclorotolueno, Método de Adição padrão	1	48
2003	Vinho	HS-SPME, PDMS	GC-ECD, PI: 2,4,6-Tribromoanisol	0,15-5,4	103
2004	Vinho	HS-SPME, DVB/CAR/PDMS	GC-MS	2,5	106
	Vinho	HS-SPME, PDMS	GC-MS	0,1	107
2005	Cortiça	MHS-SPME, DVB/CAR/PDMS	GC-MS	2,5	52

As publicações que se seguiram têm-se centrado na optimização das condições para a análise do TCA e outros cloroanisóis em vinho, de modo a conhecer a influência de diferentes dispositivos de extracção, por exemplo, extracção sorptiva em barra de agitação (SBSE)<sup>78,108</sup>, novas fases estacionárias (DVB/CAR/PDMS)<sup>48, 106</sup> e diferentes condições experimentais<sup>78,103,107</sup>.

Recentemente surgiu a metodologia de múltipla extracção na região de espaço cabeça, MHS-SPME<sup>52</sup>, aplicável na análise directa de cortiça como matriz sólida. Consiste na extracção sucessiva dos analitos do mesmo frasco, por HS-SPME, que, por aplicação de determinados modelos teóricos desenvolvidos, apresenta uma estimativa da concentração total dos analitos<sup>9</sup>.



## 1.8 Validação do Método Analítico

### 1.8.1 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico produzir resultados que sejam directamente proporcionais à concentração do analito em amostras, numa dada gama de concentração<sup>109</sup>. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da recta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad (6)$$

Onde,  $y$  é resposta medida;  $x$  é a concentração;  $a$  o declive da curva de calibração (chamado sensibilidade);  $b$  é intersecção com o eixo  $y$ , quando  $x$  é igual a 0.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) é frequentemente usado para indicar se a curva obtida pode ser considerada como modelo matemático. Normalmente é requerido um valor de  $r$  superior a 0,995.

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. Determinam-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão ( $S_i^2$  e  $S_j^2$ ) do seguinte modo:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^p \left( y_{i,j} - \bar{y} \right)^2}{n_i - 1} \quad (7)$$

Sendo,  $i$  o número do padrão e  $j$  o número de repetição efectuada para cada padrão.

As variâncias são testadas para examinar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho efectuando o cálculo do valor teste PG:

$$PG = \frac{S_p^2}{S_1^2} \text{ quando } S_p^2 > S_1^2 \quad (8)$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_p^2} \text{ quando } S_p^2 < S_1^2 \quad (9)$$

Compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição de F de Snedecor / Fisher, para n-1 graus de liberdade<sup>110</sup>:

Se  $PG \leq F$ : as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.

Se  $PG > F$ : as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitam obter  $PG \leq F$ .

## 1.8.2 Limiares Analíticos

### 1.8.2.1 Limite de Detecção

O limite de detecção (LOD) caracteriza-se por ser o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exacto<sup>109</sup>.

Em termos qualitativos, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, de uma amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito.

Para o caso em que o método envolve a utilização de uma calibração linear ter-se-á:

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \quad (10)$$

Sendo, m o declive da curva de calibração e  $S_{y/x}$  o desvio padrão residual da mesma calculado da seguinte forma:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + m \cdot x_i)]^2}{N - 2}} \quad (11)$$

Onde,  $x_i$  são os valores individuais de concentração,  $y_i$  representam os valores individuais do sinal instrumental, m e b são o declive e a ordenada na origem da curva de calibração respectivamente e N o número de padrões de calibração.

### 1.8.2.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração<sup>109</sup>.

Para o caso em que o método envolve a utilização de uma calibração linear ter-se-á:

$$LOQ = \frac{\left[ 10 \cdot S_{y/x} \right]}{m} \quad (12)$$

Sendo, m o declive da curva de calibração e  $S_{y/x}$  o desvio padrão residual da mesma.

### 1.8.3 Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos, neste caso, sobre uma mesma amostra<sup>109</sup>.

Para avaliar esta dispersão, usaram-se duas medidas extremas: a repetibilidade e a reprodutibilidade.

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efectuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível<sup>109</sup>.

O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio ( $X_i$ ,  $X_{i-1}$ ) obtidos nas condições referidas<sup>109</sup>.

Determinou-se a variância de repetibilidade associada aos resultados considerados:

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=l}^p [(n_{wi} - 1) \cdot S_{wi}^2]}{\sum_{w=l}^p (n_{wi} - 1)} \quad (13)$$

Sendo,  $S_{ri}^2$  a variância de repetibilidade associada aos resultados considerados,  $S_{wi}^2$  a variância associada aos resultados considerados,  $(n_{wi} - 1)$  os graus de liberdade da série de análises e  $p$  o número de laboratórios participantes.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade ( $r$ ) é avaliado segundo:

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_{ri} = 1,96 \times \sqrt{2} \times S_{ri} = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (14)$$

Onde,  $S_{ri}$  representa o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados.

O Coeficiente de Variação de Repetibilidade ( $CV_r$ ), para cada nível de concentrações, expresso em percentagem, é dado por:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (15)$$

Sendo  $CV_r$  numericamente igual ao desvio padrão de repetibilidade ( $S_{ri}$ ) a dividir pela média dos valores considerados ( $\bar{x}$ ).

A reprodutibilidade refere-se à precisão do método efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição (diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos, épocas diferentes)<sup>109</sup>.

O limite de reprodutibilidade ( $R$ ) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas<sup>109</sup>.

O valor da variância associada à reprodutibilidade é calculado do seguinte modo:

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad (16)$$

sendo,  $S_{Ri}^2$  a variância da reprodutibilidade,  $S_{Li}^2$  a variância entre operadores (variância dos erros sistemáticos) e  $S_{ri}^2$  a variância de repetibilidade (variância dos erros aleatórios).

$$S_{Li}^2 = \frac{S_{di}^2 - S_{ri}^2}{n_i} \quad (17)$$

$$S_{di}^2 = \frac{1}{p-1} \times \sum_{w=l}^p n_{wi} \times (\overline{x_{wi}} - \overline{x_i})^2 \quad (18)$$

$$\overline{n_i} = \frac{1}{p-1} \times \left[ \sum_{wi=l}^p n_{wi} - \frac{\sum_{w=l}^p n_{wi}^2}{\sum_{w=l}^p n_{wi}} \right] \quad (19)$$

onde,  $S_{ri}^2$  a variância de repetibilidade associada aos resultados considerados para cada operador,  $n_{wi}$  o número de ensaios efectuados pelo operador para um determinada amostra, p o número de operadores participantes e  $\overline{x_{wi}}$  a média aritmética dada pelo operador para uma determinada amostra. (Quando apresentam dois traços em cima, representa a média das médias dessa grandeza x).

Para um nível de confiança de 95%, o limite de reprodutibilidade (R) é avaliado segundo:

$$R = t \times \sqrt{2} \times S_{Ri} = 1,96 \times \sqrt{2} \times S_{Ri} = 2,8 \times \sqrt{S_{Ri}^2} \quad (20)$$

Sendo,  $t$  o valor tabelado t de Student,  $S_{Ri}$  o desvio padrão de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada operador;  $S_{Ri}^2$  a variância de reprodutibilidade associada aos resultados considerados para cada operador.

O Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade ( $CV_R$ ), expresso em percentagem, é dado por:

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (21)$$

Sendo  $CV_R$  numericamente igual ao desvio padrão de reprodutibilidade ( $S_{Ri}$ ) a dividir pela média dos valores considerados ( $\bar{x}$ ).

#### 1.8.4 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se se mostrar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado<sup>109</sup>.

Para determinar a robustez testou-se o método em condições de precisão intermédia, isto é, fez-se variar as condições operatórias dentro do próprio laboratório<sup>109</sup>, definindo exactamente quais as condições a variar. As variáveis foram os analistas em diferentes dias.

Esta medida de precisão é conhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar.

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem vários métodos para determinação e controlo desse parâmetro de qualidade. Para o trabalho em questão vai ser usada a seguinte expressão:

$$Si_{(TO)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (22)$$

onde,  $Si( )$  é o desvio padrão de precisão intermédia (TO – tempo e operadores diferentes),  $t$  corresponde ao nº de amostras ensaiadas;  $n$  ao número de ensaios efectuados por amostra;  $j$  o nº da amostra (que vai de 1 a  $t$  amostras);  $k$ , nº do resultado obtido para a amostra  $j$ ;  $y_{jk}$  o resultado individual ( $k$ ) para a amostra  $j$  de 1 a  $t$ ;  $\bar{y}_j$  representa a média aritmética dos resultados da amostra  $j$  de 1 a  $t$ .

## 1.9 Enquadramento e Objectivos do Trabalho

A indústria corticeira tem vindo a atravessar, nos tempos recentes, algumas dificuldades. Os produtos alternativos que têm vindo a surgir, como as rolhas de polímeros, as rolhas de rosca (*screwcap*), assim como embalagens *tetrapack*, não serão certamente substitutos da rolha de cortiça natural, mas contribuem para um decréscimo na sua utilização<sup>111,112</sup>.

É actualmente bem nítida, em todo o Mundo, a crescente exigência do consumidor e preferência pelo consumo de vinhos de elevada qualidade, o que passa também pela qualidade da rolha. Hoje como no passado, é a rolha de cortiça natural um produto nobre, que representa uma valorização notável no contexto sócio-económico português<sup>112</sup>.

A maioria dos estudos sobre defeitos de aroma associados à rolha de cortiça tem incidido quase exclusivamente sobre o TCA. Isto porque o TCA tem vindo a ser reconhecido como sendo o principal problema da rolha de cortiça, presente em mais de 80% dos casos de desvio organoléptico<sup>113,114</sup>. Assim, os esforços do controlo da qualidade da cortiça têm vindo a ser investidos essencialmente no desenvolvimento de metodologias nesta área, incluindo na normalização de métodos de ensaio em rolhas de cortiça pela Organização Internacional de Normalização (ISO)<sup>115</sup>.

Os estudos de caracterização sensorial da cortiça têm-se restringido apenas à verificação da qualidade organoléptica. Na indústria corticeira, pensa-se que poderá existir uma relação entre a quantidade de TCA e alguns parâmetros de qualidade das rolhas de cortiça, nomeadamente a qualidade visual e o calibre.

O presente trabalho tem como objectivo verificar a existência de relações entre a quantidade de TCA presente nas rolhas de cortiça e alguns parâmetros de qualidade (qualidade visual, calibre e fornecedores) de modo a encontrar dados objectivos que ajudem a explicar dados empíricos do meio corticeiro.

Todo o trabalho foi executado numa empresa do ramo corticeiro em plena actividade nas condições reais de trabalho diário desenvolvido no ano de 2007. A empresa adquiria lotes de rolhas de cortiça semi-elaboradas, isto é, lotes de rolhas de cortiça que ainda não tinham sido submetidas aos processos de acabamento. Todos os lotes possuíam informação sobre qualidade visual, calibre e fornecedor. As rolhas foram analisadas por HS-SPME/GC-ECD. Esta metodologia é usada na rotina diária da empresa, sendo um método interno (validado na dita empresa) baseado na norma internacional para a análise de TCA na cortiça<sup>115</sup>.

## 2. Procedimento Experimental

---



## 2.1 Reagentes e Materiais

No presente trabalho, utilizaram-se os seguintes reagentes: 2,4,6-Tricloroanisol (99%, Sigma-Aldrich) e 2,4,6-Triclorofenetol (99%, Sigma-Aldrich), sendo este último usado como padrão interno. Na Figura 13 encontram-se as respectivas fórmulas e estruturas químicas. Usou-se também cloreto de sódio (99,5%, Panreac) e etanol p.a. (99%, Riedel-deHaen).

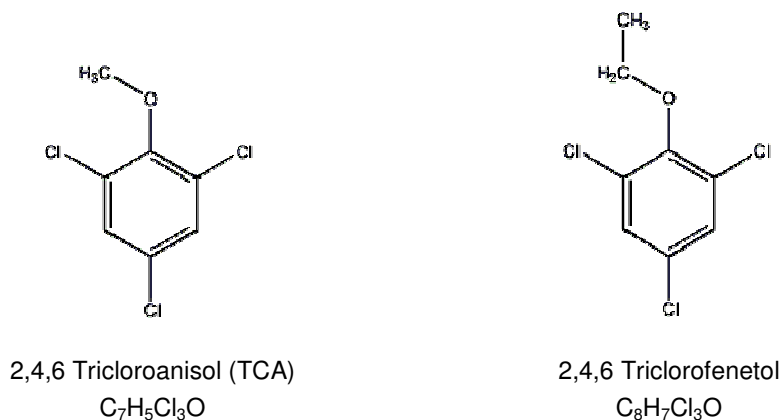


Figura 13 – Estrutura e fórmula química dos padrões usados.

Para a realização da curva de calibração do TCA, prepararam-se soluções padrão de TCA em simulante de vinho (solução etanol/água a 12% v/v).

Os padrões da curva de calibração continham uma quantidade fixa de padrão interno (20,0 ng/L) e as seguintes quantidades de TCA: 0,63; 1,59; 3,18; 6,75; 9,90; 16,75 ng/L.

Foram usadas Fibras SPME (Supelco) com uma fase estacionária PDMS (100  $\mu$ m), condicionada durante 1 hora a 250°C sendo utilizada num suporte manual.

Foram utilizados vials de 20 mL de vidro com septos de Silicone/Teflon 16 mm (45°, dureza A, 1,3 mm de espessura) e tampas de rosca e magnéticas.

## 2.2 Equipamento

O equipamento utilizado no presente trabalho foi um Cromatógrafo de fase Gasosa Varian CP 3380 com um detector de captura electrónica  $^{63}\text{Ni}$  (GC-ECD), equipado com uma coluna capilar Varian VF-5ms (30 m  $\times$  0,25 mm i.d., 0,25  $\mu$ m de espessura de filme). Usou-se um *liner* de vidro Varian 0,75 mm i.d., 6,5 mm o.d. e 78,5 mm de comprimento.

## 2.3 Amostragem

No presente trabalho foram estudadas apenas rolhas de cortiça natural. Foram realizadas cerca de 1100 análises correspondentes a amostras provenientes de 500 lotes de rolhas num total de 70 milhões de rolhas. Os lotes de rolhas de cortiça dão entrada nas instalações fabris, em sacos limpos, devidamente identificados, cada um com capacidade para cinco mil rolhas. Estes lotes são colocados em filas de vinte sacos sendo que metade do lote é colocado com a abertura para cima e a outra metade é colocada com a abertura para baixo. Seguidamente é efectuada uma amostragem de acordo com a norma NP 2922 (Tabela 6) usando, um nível geral de inspecção normal definido previamente pela empresa, por exemplo, para lotes até 150.000, são recolhidas um total de 200 rolhas de todos os sacos (nível geral de inspecção normal I). Estas rolhas seguem para o laboratório onde é efectuada nova amostragem desta vez, recorrendo a um nível especial de inspecção reduzida, seguindo o exemplo anterior, são efectuadas 3 análises ao TCA (nível especial de inspecção reduzida S-1). Cada análise é executada em duplicado.

**Tabela 6 - Tabela de Amostragem de Acordo com a NP 2922 para análise do TCA.**

Efectivo do Lote	Níveis Especiais de Inspeção (Reduzida)				Níveis Gerais de Inspeção (Normal)		
	S-1	S-2	S-3	S-4	I	II	III
≤ 150.000	3				200		
150.001 a 500.000		5				800	

No presente trabalho foram considerados três parâmetros de qualidade: a qualidade visual, o calibre (comprimento da rolha) e os fornecedores. A qualidade visual e o calibre são considerados pela indústria corticeira e vitivinícola, ainda que sem suporte científico, como parâmetros de qualidade. Os fornecedores foram considerados parâmetros de qualidade uma vez que o seu desempenho pode ser condicionante para o processo de fabricação e armazenagem das rolhas de cortiça. Relativamente à qualidade visual, foram estudadas seis classes individuais: Flôr, Extra, Superior, 1º, 2º e 3º e uma sétima classe mista constituída por 4º/5º. Quanto aos calibres, estudaram-se os de comprimento 45, 49 e 54 mm todos com diâmetro 24 mm. Foram estudados nove fornecedores identificados como F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8 e F9, todos eles associam a preparação da cortiça com a produção de rolhas.

Na Tabela 7, estão descritos os estudos efectuados consoante fornecedor, calibre e qualidade.

**Tabela 7 - Tabela demonstrativa dos estudos efectuados consoante fornecedor, calibre e qualidade.**

Fornecedor	Calibre	Qualidade
F1	45X24	Flôr, Extra, Superior, 1º, 2º, 3º
	49x24	Flôr, Extra
F2	45X24	Flôr, Extra, Superior, 1º, 2º
F3	45X24	Extra, Superior, 1º, 2º, 3º, 4º/5º
F4	45X24	Extra, Superior, 1º, 2º, 3º, 4º/5º
	49x24	Flôr, Extra
	54X24	Flôr, Extra
F5	45X24	Flôr, Extra, Superior, 1º, 2º, 3º
F6	45X24	Extra, 2º, 4º/5º
	49x24	Extra, Superior
F7	45X24	Extra, Superior, 1º, 2º, 3º, 4º/5º
	49x24	Flôr, Extra
F8	45X24	Flôr, Extra, Superior, 1º, 2º, 3º, 4º/5º
	49x24	Flôr, Extra, Superior, 1º
	54X24	Flôr, Superior
F9	45X24	Flôr, Extra, Superior, 1º, 2º, 3º

A Tabela 8 indica o número de análises efectuadas por fornecedores, calibre e qualidades visuais usadas no presente trabalho.

**Tabela 8 - Número de análises efectuadas por fornecedor, calibre e qualidade visual.**

Fornecedor	Calibre	Qualidade Visual							Total
		Flôr	Extra	Superior	1º	2º	3º	4º/5º	
F1	45X24	39	107	53	67	85	78		430
	49x24	7	16						23
F2	45X24	6	15	18	59	33			131
F3	45X24		12	2	10	9	13	3	49
F4	45X24		5	6	3	6	3	1	24
	49x24	1	19						20
	54X24	6	4						10
F5	45X24	4	11	9	11	10	14		59
F6	45X24		10			27		2	39
	49x24		19	10					29
F7	45X24		9	8	5	7	11	13	53
	49x24	13	12						25
F8	45X24	2	9	1	8	15	12	12	59
	49x24	18	18	2	8				46
	54X24	15		2					17
F9	45X24	16	2	2	28	30	21		99
Total		127	268	113	199	222	152	31	1112

## 2.4 Preparação da Amostra e Metodologia de HS-SPME/GC-ECD

Para a preparação do macerado, colocaram-se 20 rolhas num frasco de vidro âmbar esmerilhado de 1000 mL<sup>115</sup>. Em seguida, encheu-se com 750 mL de simulante de vinho, de modo que as rolhas ficassem totalmente submersas. Tapou-se o frasco com a tampa de vidro respectiva e selou-se com parafilme. Deixou-se macerar durante 24 horas<sup>115</sup>.

As soluções padrão de calibração foram analisadas no mesmo equipamento exactamente nas mesmas condições das amostras a analisar. A curva de calibração foi verificada entre séries de análises e sempre que se mudou de fibra.

Os parâmetros relativos ao volume de espaço de cabeça/volume de amostra (razão  $\beta$ ) , adição de sal, tempo de sorção e dessorção assim como temperatura de extracção foram estabelecidos com base na ISO/CD 20752.2<sup>115</sup>:

- Razão  $1/\beta = 1$ , alíquotas de 10 mL de padrão ou amostra em *vials* de 20 mL.
- Adição de NaCl: 0,3 g/mL.
- Tempo de extracção: 20 minutos, sob agitação a 500 r.p.m.
- Temperatura de extracção: 30 °C.
- Tempo de dessorção: 5 minutos.

Pesaram-se cerca de 3g de NaCl para um frasco de 20 mL. Retirou-se uma alíquota de 10 mL da solução do macerado para esse mesmo frasco. Adicionaram-se 40  $\mu$ L de padrão interno (concentração na amostra de 20 ng/L) para o respectivo frasco. Fechou-se o frasco com uma tampa de alumínio de rosca e septo (parte de teflon virada para o interior).

Colocou-se o frasco num banho de água a temperatura constante de 30°C e sob agitação (500 rpm). Em seguida, inseriu-se a fibra de SPME no espaço de cabeça do *frasco* durante 20 minutos. Por fim, recolheu-se a fibra para o interior do suporte e injectou-se no GC-ECD. Realizaram-se 2 réplicas para cada amostra.

### 2.4.1 Análise por GC-ECD

A fibra de SPME contendo os compostos voláteis sorvidos foi introduzida no injectador (modo splitless 5 minutos) do cromatógrafo (260°C) onde permaneceu 5 minutos para permitir a dessorção térmica dos compostos. O programa de temperatura do forno foi de 70 °C durante 2 minutos, subida de temperatura até 250°C a 10°C por minuto aí permanecendo durante 2 minutos. O Hélio foi utilizado como gás de arrasto com um fluxo de 1mL/min. A temperatura do detector foi

de 280°C. Foi realizado um branco por cada grupo de 10 análises. O branco consistiu num frasco com simulante de vinho e cloreto de sódio (3g).

## 2.5 Tratamento de Dados

Para cada uma das soluções padrão preparada, foram determinadas as áreas cromatográficas correspondentes ao TCA e ao padrão interno. Fez-se a representação gráfica da razão das áreas ( $\text{área}_{\text{TCA}}/\text{área}_{\text{Padrão Interno}}$ ) em função da razão das concentrações ( $\text{concentração}_{\text{TCA}}/\text{concentração}_{\text{Padrão Interno}}$ ) e estabeleceu-se uma curva de calibração. Todas as amostras foram quantificadas com recurso à respectiva curva de calibração.

A linearidade foi avaliada através da análise do coeficiente de correlação da curva de calibração efectuada para esse efeito.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pelas equações 10 e 12 respectivamente.

Para determinar a repetibilidade efectuaram-se dez medições sobre o padrão mais baixo usado para construir a curva de calibração.

Para determinar a reprodutibilidade efectuaram-se dez medições sobre uma mesma amostra e por dois operadores diferentes.

A repetibilidade e a reprodutibilidade foram avaliadas pela análise dos respectivos coeficientes de variação, calculados pelas equações 12 e 18 respectivamente, expressos em percentagem.

A robustez do método foi avaliada pela precisão intermédia calculada pela equação 19.

Para proceder à análise da relação entre fornecedores, calibre e qualidade visual foi escolhida a medida de tendência central mediana, em detrimento da média e medida de dispersão amplitude interquartilica<sup>116</sup> em vez do desvio padrão.

A média tem indicação de uso em distribuições simétricas. Possui o maior poder matemático e é a medida descritiva mais utilizada. No entanto, é afectada por valores extremos e em distribuições assimétricas pode apresentar uma informação distorcida. A Mediana (Med.) é uma medida de posicionamento, representando o valor que ocupa a posição central numa série. Define-se como sendo o valor  $X_i$  tal que, depois de ordenados por ordem crescente todas as observações da variável  $X$ , 50% das observações sejam superiores ou iguais à mediana e 50% sejam inferiores ou iguais à mediana<sup>116</sup>. Não é afectada por valores extremos, daí ser preferida em séries com distribuição assimétrica. A mediana é mais robusta do que a média como medida de localização, pois é menos sensível aos valores aberrantes. Assim, no caso concreto do presente trabalho considerou-se a mediana como valor de referência mais importante, pois a média aritmética apresentava-se influenciada por valores extremos.

Para o estudo da relação entre fornecedores, calibre e qualidade visual, recorreu-se a cartas de distribuição de amostragem<sup>117</sup>. As cartas de distribuição de amostragem estão organizadas por fornecedor e por calibre, consoante as qualidades existentes para cada fornecedor. Representaram-se várias linhas nas cartas de distribuição de amostragem:

- Duas linhas vermelhas correspondentes ao intervalo do limite de percepção sensorial (LPS): 1,5 ng/L e 3 ng/L, limite inferior e limite superior de LPS respectivamente.
- Uma linha rosa velho correspondente à mediana da qualidade visual *Flôr* (caso exista).
- Uma linha verde correspondente à mediana da qualidade visual *Extra* (caso exista).
- Uma linha roxa correspondente à mediana da qualidade visual *Superior* (caso exista).
- Uma linha azul correspondente à mediana da qualidade visual *1º* (caso exista).
- Uma linha preta correspondente à mediana da qualidade visual *2º* (caso exista).
- Uma linha amarela correspondente à mediana da qualidade visual *3º* (caso exista).
- Uma linha rosa correspondente à mediana da qualidade visual *4º/5º* (caso exista).

Associado ao estudo dos fornecedores, com calibre e qualidade visual, foi elaborado um gráfico do valor de TCA (ng/L) em função da mediana da variável a estudar. A medida de dispersão utilizada foi a amplitude interquartílica (*AIQ*)<sup>116</sup>. Não foi usado o desvio padrão uma vez que este representa o padrão de oscilações que os valores da série apresentam em relação à média, é frequentemente usado em conjunto com a média e, como esta, também é afectado por valores extremos. O desvio padrão é uma medida de dispersão baseada na média. A amplitude interquartílica é uma medida de dispersão baseada em percentis. É a diferença entre o 3º quartil (*i.e.* o valor de  $x_i$  superior ou igual 75% das observações da amostra depois de estas terem sido ordenadas por ordem crescente, também designado por percentil 75) e o 1º quartil (*i.e.* o valor de  $x_i$  superior ou igual 25% das observações da amostra depois de estas terem sido ordenadas por ordem crescente, também designado por percentil 25)<sup>116</sup>. A *AIQ* engloba 50% das observações da amostra.

### 3. Resultados e Discussão

---

### 3.1 Validação do Método HS-SPME/GC-ECD

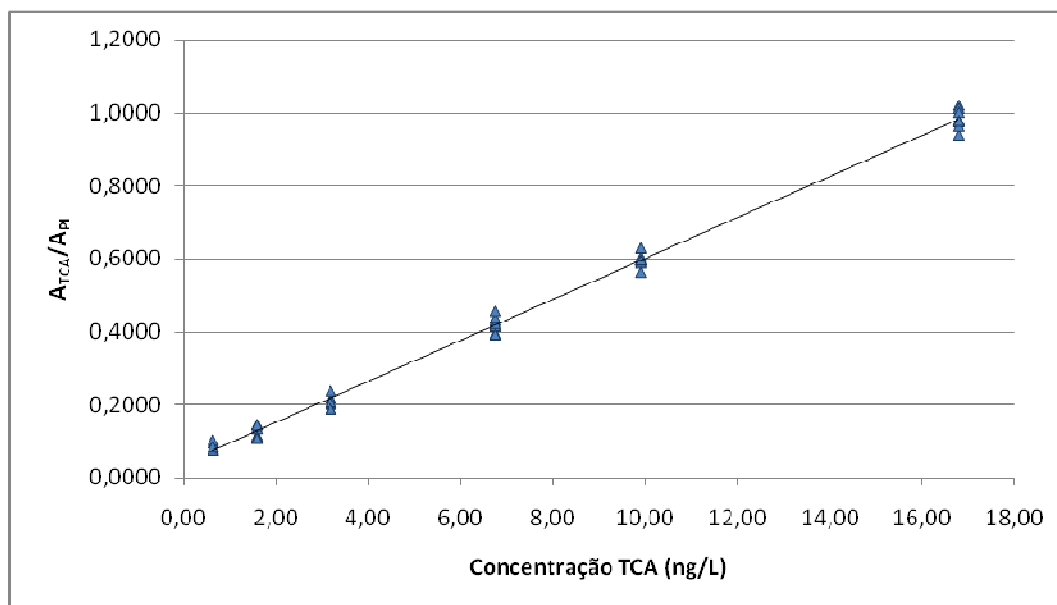
#### 3.1.1 Linearidade do Método de HS-SPME/GC-ECD

Para o estudo da linearidade preparou-se uma curva de calibração para o TCA (Figura 14). A curva de calibração linear calculada assume que há homogeneidade de variâncias em toda a gama de concentrações. A homogeneidade das variâncias foi verificada através do Teste de Fisher de acordo com o descrito em 1.8.1.

Foram usados seis padrões, sendo cada um analisado em duplicado. Foram acrescentados 36 padrões de verificação (4 por cada padrão já existente). A Tabela 9 apresenta os parâmetros estatísticos da curva de calibração:

**Tabela 9- Parâmetros estatísticos da curva de calibração do TCA**

Composto	Gama de Concentração	R <sup>2</sup>	Equação da recta
TCA	0,63 – 16,75 ng/L	0,9964	$y = 5,620 \times 10^{-2}x + 3,920 \times 10^{-2}$



**Figura 14- Curva de calibração do TCA**

Observou-se uma relação linear entre a razão das áreas cromatográficas ( $\text{área}_{TCA}/\text{área}_{\text{Padrão Interno}}$ ) e a concentração do TCA, o valor de coeficiente de regressão linear ao quadrado ( $R^2$ ) é de 0,9964. Este valor indica que o método analítico produz resultados que são directamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, na gama de concentração usada.



### 3.1.2 Limiares Analíticos

Para a determinação dos limites de detecção e de quantificação seguiu-se a metodologia descrita em 1.8.2.1 e 1.8.2.2 respectivamente, recorrendo aos parâmetros da curva de calibração identificados em 3.1.1.

**Tabela 10 – Determinação dos Limites de Detecção e Quantificação**

[TCA]	$A_{TCA}/A_{PI}$	$ Y_i - (b + mX_i) ^2$	Parâmetros
0,63	$7,48 \times 10^{-2}$	$4,16 \times 10^{-8}$	m: $5,620 \times 10^{-2}$ b: $3,920 \times 10^{-2}$ $S_{y/x}$ : $3,54 \times 10^{-3}$
1,59	$1,26 \times 10^{-1}$	$8,81 \times 10^{-6}$	
3,18	$2,20 \times 10^{-1}$	$4,34 \times 10^{-6}$	
6,75	$4,20 \times 10^{-1}$	$3,77 \times 10^{-6}$	LOD: 0,21 ng/L
9,90	$5,96 \times 10^{-1}$	$3,17 \times 10^{-8}$	LOQ: 0,63 ng/L
16,75	$9,89 \times 10^{-1}$	$3,60 \times 10^{-5}$	
Soma		$5,30 \times 10^{-5}$	

Por análise da Tabela 10, verificou-se que o desvio padrão residual da curva de calibração é de  $3,64 \times 10^{-3}$ . Os limites de detecção e quantificação encontrados são de 0,21 ng/L e 0,65 ng/L respectivamente. O limite de quantificação corresponde ao padrão de calibração de menor concentração.

### 3.1.3 Precisão do Método de HS-SPME/GC-ECD

#### 3.1.3.1 Repetibilidade

Preparou-se o padrão de TCA de concentração mais baixa, 0,63 ng/L. Analisou-se dez vezes de acordo com a metodologia descrita em 1.8.2. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 11.

**Tabela 11- Avaliação da Repetibilidade do Método de HS-SPME/GC-ECD**

Padrão inferior: 0,63 ng/L			Parâmetros
A <sub>PI</sub>	A <sub>TCA</sub>	A <sub>TCA</sub> /A <sub>PI</sub>	
194304	14549	7,49x10 <sup>-2</sup>	<b>Média:</b> 7,50x10 <sup>-2</sup> <b>Desvio Padrão:</b> 1,06x10 <sup>-3</sup> <b>S<sub>ii</sub><sup>2</sup>:</b> 8,77x10 <sup>-7</sup> <b>r:</b> 2,62x10 <sup>-3</sup> <b>CV (%)</b> : 1,2 <b>Conc. Média:</b> 0,64 ng/L
181582	13839	7,62x10 <sup>-2</sup>	
182921	13684	7,48x10 <sup>-2</sup>	
146504	11157	7,62x10 <sup>-2</sup>	
206908	15383	7,43x10 <sup>-2</sup>	
153624	11465	7,46x10 <sup>-2</sup>	
182003	13685	7,52x10 <sup>-2</sup>	
184136	13700	7,44x10 <sup>-2</sup>	
209010	15976	7,64x10 <sup>-2</sup>	
199890	14579	7,29x10 <sup>-2</sup>	

Por análise da Tabela 11, para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade da metodologia de HS-SPME/GC-ECD é 2,62x10<sup>-3</sup>. Ou seja, é o valor máximo ao qual se situa a diferença absoluta entre dois resultados experimentais obtidos em condições de repetibilidade

A repetibilidade expressa em termos de coeficiente de variação é de 1,2%.

### 3.1.3.2 Reprodutibilidade

Preparou-se um padrão de TCA de concentração 0,63 ng/L. Foram efectuadas 10 análises, por dois operadores diferentes, com o intuito de se avaliar a reprodutibilidade do método HS-SPME/GC-ECD. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 12.

**Tabela 12 - Avaliação da Reprodutibilidade do Método de HS-SPME/GC-ECD**

Conc. ng/L	Operador 1				Operador 2			
	A <sub>PI</sub>	A <sub>TCA</sub>	A <sub>TCA</sub> /A <sub>PI</sub>	[TCA]	A <sub>PI</sub>	A <sub>TCA</sub>	A <sub>TCA</sub> /A <sub>PI</sub>	[TCA]
0,63	194304	14549	$7,49 \times 10^{-2}$	0,63	200301	14949	$7,46 \times 10^{-2}$	0,63
0,63	181582	13839	$7,62 \times 10^{-2}$	0,66	172435	12897	$7,48 \times 10^{-2}$	0,63
0,63	182921	13684	$7,48 \times 10^{-2}$	0,63	189921	14376	$7,57 \times 10^{-2}$	0,65
0,63	146504	11157	$7,62 \times 10^{-2}$	0,66	146359	10876	$7,43 \times 10^{-2}$	0,62
0,63	206908	15383	$7,43 \times 10^{-2}$	0,63	182003	13685	$7,52 \times 10^{-2}$	0,64
0,63	153624	11465	$7,46 \times 10^{-2}$	0,63	153524	11956	$7,79 \times 10^{-2}$	0,69
0,63	182003	13685	$7,52 \times 10^{-2}$	0,64	201457	15134	$7,51 \times 10^{-2}$	0,64
0,63	184136	13700	$7,44 \times 10^{-2}$	0,63	197689	14783	$7,48 \times 10^{-2}$	0,63
0,63	209010	15976	$7,64 \times 10^{-2}$	0,66	198760	14976	$7,53 \times 10^{-2}$	0,64
0,63	199890	14579	$7,29 \times 10^{-2}$	0,60	196435	14599	$7,43 \times 10^{-2}$	0,62
		Média	$7,50 \times 10^{-2}$	0,64			$7,52 \times 10^{-2}$	0,64
		Desvio Padrão	$1,06 \times 10^{-3}$				$1,04 \times 10^{-3}$	
		$S_{Ri}^2$				$2,75 \times 10^{-6}$		
		R				$4,64 \times 10^{-3}$		
		CV (%)	2,21				2,20	

Por análise da Tabela 12, para um nível de confiança de 95%, o limite de reprodutibilidade é de  $4,64 \times 10^{-3}$ . Ou seja,  $4,64 \times 10^{-3}$  é o valor máximo ao qual se situa a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio obtidos em condições de reprodutibilidade.

A reprodutibilidade expressa em termos de coeficiente de variação é 2,2 %.

### 3.1.4 Robustez do Método de HS-SPME-GC-ECD

Prepararam-se dois padrões de TCA, um de 3,18 ng/L e outro de 9,90 ng/L. Foram efectuadas sete análises, por dois operadores diferentes, em dias diferentes com o intuito de se avaliar a precisão intermédia do método de HS-SPME/GC-ECD.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 13 e Tabela 14.

**Tabela 13 - Avaliação da Precisão Intermédia do Método de HS-SPME/GC-ECD**

Data	Conc. ng/L	Operador 1				Operador 2			
		A <sub>PI</sub>	A <sub>TCA</sub>	A <sub>TCA/API</sub>	[TCA]	A <sub>PI</sub>	A <sub>TCA</sub>	A <sub>TCA/API</sub>	[TCA]
03/09/07	3,18	175023	38250	$2,19 \times 10^{-1}$	3,19	176590	39456	$2,23 \times 10^{-1}$	3,28
	9,90	194891	116243	$5,96 \times 10^{-1}$	9,92	193891	114879	$5,92 \times 10^{-1}$	9,85
04/09/07	3,18	175999	38448	$2,18 \times 10^{-1}$	3,19	160087	35017	$2,19 \times 10^{-1}$	3,19
	9,90	271735	162965	$6,00 \times 10^{-1}$	9,97	260735	154679	$5,93 \times 10^{-1}$	9,86
05/09/07	3,18	189253	40932	$2,16 \times 10^{-1}$	3,15	198670	43678	$2,20 \times 10^{-1}$	3,21
	9,90	197152	116922	$5,93 \times 10^{-1}$	9,86	196263	117922	$6,01 \times 10^{-1}$	9,99
10/09/07	3,18	157675	34567	$2,19 \times 10^{-1}$	3,20	199976	43567	$2,18 \times 10^{-1}$	3,18
	9,90	254854	152210	$5,97 \times 10^{-1}$	9,93	256854	156610	$6,10 \times 10^{-1}$	10,15
11/09/07	3,18	156960	33599	$2,14 \times 10^{-1}$	3,11	247987	54328	$2,19 \times 10^{-1}$	3,20
	9,90	221566	131925	$5,95 \times 10^{-1}$	9,90	221675	133000	$6,00 \times 10^{-1}$	9,98
12/09/07	3,18	122678	26598	$2,17 \times 10^{-1}$	3,16	150678	32560	$2,16 \times 10^{-1}$	3,15
	9,90	242239	144345	$5,96 \times 10^{-1}$	9,91	221239	132345	$5,98 \times 10^{-1}$	9,95
17/09/07	3,18	197865	42990	$2,17 \times 10^{-1}$	3,17	214212	45612	$2,13 \times 10^{-1}$	3,09
	9,90	202345	120690	$5,96 \times 10^{-1}$	9,92	222943	132579	$5,95 \times 10^{-1}$	9,88

**Tabela 14 – Resultados obtidos Para a Precisão Intermédia do Método de HS-SPME/GC-ECD**

Dia	Operador 1		Operador 2	
	A <sub>TCA/API</sub> (3,18 ng/L)	A <sub>TCA/API</sub> (9,90 ng/L)	A <sub>TCA/API</sub> (3,18 ng/L)	A <sub>TCA/API</sub> (9,90 ng/L)
1	$2,19 \times 10^{-1}$	$5,96 \times 10^{-1}$	$2,23 \times 10^{-1}$	$5,92 \times 10^{-1}$
2	$2,18 \times 10^{-1}$	$6,00 \times 10^{-1}$	$2,19 \times 10^{-1}$	$5,93 \times 10^{-1}$
3	$2,16 \times 10^{-1}$	$5,93 \times 10^{-1}$	$2,20 \times 10^{-1}$	$6,01 \times 10^{-1}$
4	$2,19 \times 10^{-1}$	$5,97 \times 10^{-1}$	$2,18 \times 10^{-1}$	$6,10 \times 10^{-1}$
5	$2,14 \times 10^{-1}$	$5,95 \times 10^{-1}$	$2,19 \times 10^{-1}$	$6,00 \times 10^{-1}$
6	$2,17 \times 10^{-1}$	$5,96 \times 10^{-1}$	$2,16 \times 10^{-1}$	$5,98 \times 10^{-1}$
7	$2,17 \times 10^{-1}$	$5,96 \times 10^{-1}$	$2,13 \times 10^{-1}$	$5,95 \times 10^{-1}$
8	$2,17 \times 10^{-1}$	$5,96 \times 10^{-1}$	$2,13 \times 10^{-1}$	$5,95 \times 10^{-1}$
9	$2,17 \times 10^{-1}$	$5,96 \times 10^{-1}$	$2,13 \times 10^{-1}$	$5,95 \times 10^{-1}$
<b>Média</b>	$2,17 \times 10^{-1}$	$5,96 \times 10^{-1}$	$2,18 \times 10^{-1}$	$5,98 \times 10^{-1}$
<b>D. Padrão</b>	$1,75 \times 10^{-3}$	$2,00 \times 10^{-3}$	$3,25 \times 10^{-3}$	$5,94 \times 10^{-3}$
<b>Si<sub>(TO)5ng/L</sub></b>	$2,61 \times 10^{-3}$		<b>Si<sub>(TO)15ng/L</sub></b>	$4,44 \times 10^{-3}$
<b>R<sub>5ng/L</sub></b>	$7,31 \times 10^{-3}$		<b>R<sub>15ng/L</sub></b>	$1,24 \times 10^{-2}$
<b>CV (%)<sub>3,18 ng/L</sub></b>	1,2		<b>CV (%)<sub>9,90 ng/L</sub></b>	0,74

Por observação da Tabela 14 conclui-se que o desvio padrão de precisão intermédia para a concentração de 3,18 ng/L e de 9,90 ng/L é de  $2,61 \times 10^{-3}$  e  $4,44 \times 10^{-3}$  respectivamente. A variação dos parâmetros operadores e tempo não alterou de forma significativa os valores dos padrões de TCA tal como se pode verificar pelo desvio padrão de precisão intermédia. Estes resultados evidenciam uma variabilidade de 1,2% e 0,74% para os padrões 3,18ng/L e 9,90ng/L respectivamente, permitindo considerar o método de HS-SPME/GC-ECD robusto.

### 3.2 Determinação do 2,4,6-TCA em Rolhas de Cortiça

#### 3.2.1 Possível Relação Fornecedor, Calibre e Qualidade Visual

Estudou-se cada fornecedor relativamente a cada calibre e qualidade visual recorrendo aos valores de mediana de TCA em ng/L encontrados. Sempre que se referir valor, quer dizer valor de mediana de TCA em ng/L..

Por observação da Tabela 15, e pelas Figura 15 e Figura 16, calibre 45x24 e 49x24 respectivamente, para o F1, constatou-se que todas as medianas referentes às qualidades visuais estudadas estão dentro dos limites de percepção sensorial.

**Tabela 15 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F1 por calibre e qualidade visual**

Calibre	Qualidade Visual							Mediana/ Calibre	Mediana Global
	Flôr	Extra	Superior	1º	2º	3º	4º/5º		
45x24	2,1	2,4	1,7	1,8	2,1	2,6	-	2,1	2,0
49x24	1,9	2,0	-	-	-	-	-	2,0	

Relativamente aos calibres, para 45x24,o valor mais baixo de TCA é encontrado para a qualidade *Superior* (1,7 ng/L), enquanto o valor mais elevado de TCA verifica-se para a qualidade *3º* (2,6 ng/L). Para o 49x24 os valores encontrados para as classes estudadas são muito próximos, 1,9 ng/L e 2,0 ng/L para *Flôr* e *Extra* respectivamente.

Comparando iguais qualidades visuais, mas em calibres diferentes, verificou-se que os valores para o calibre de menor dimensão (45x24) eram superiores aos valores para o calibre de maior dimensão (49x24).

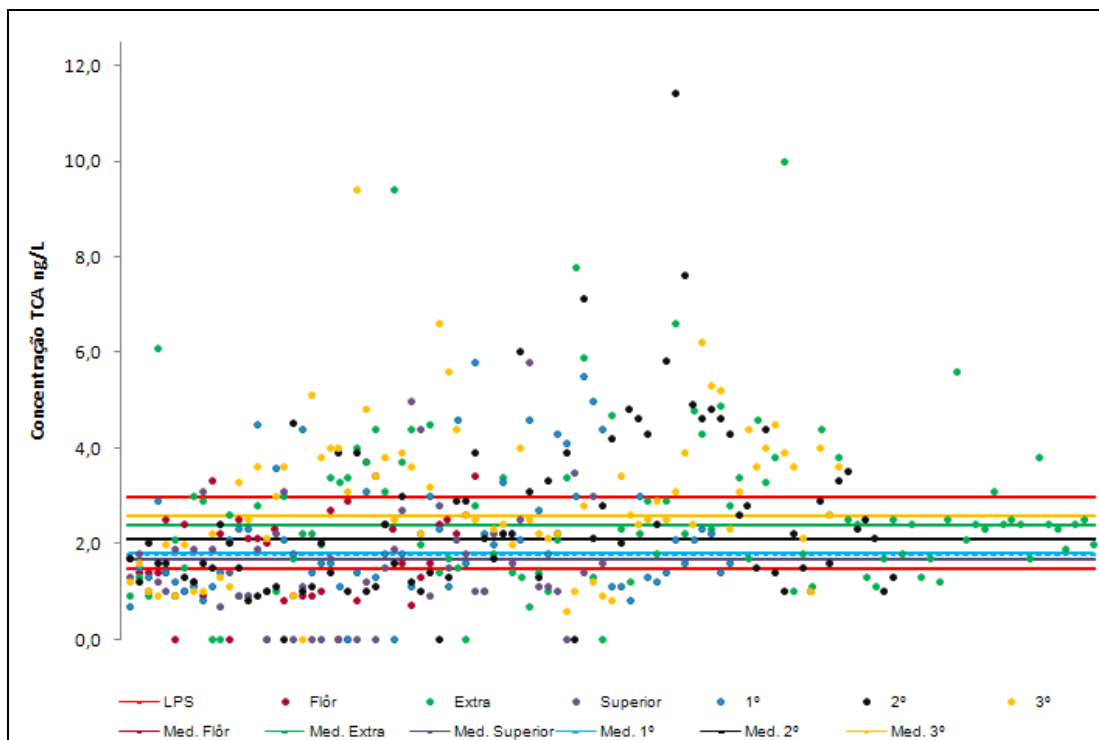


Figura 15 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F1 calibre 45x24.

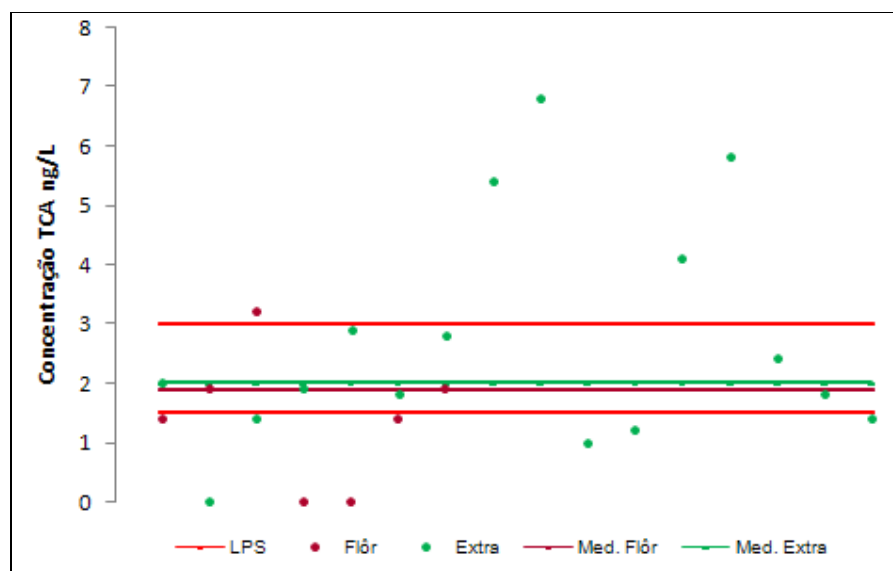


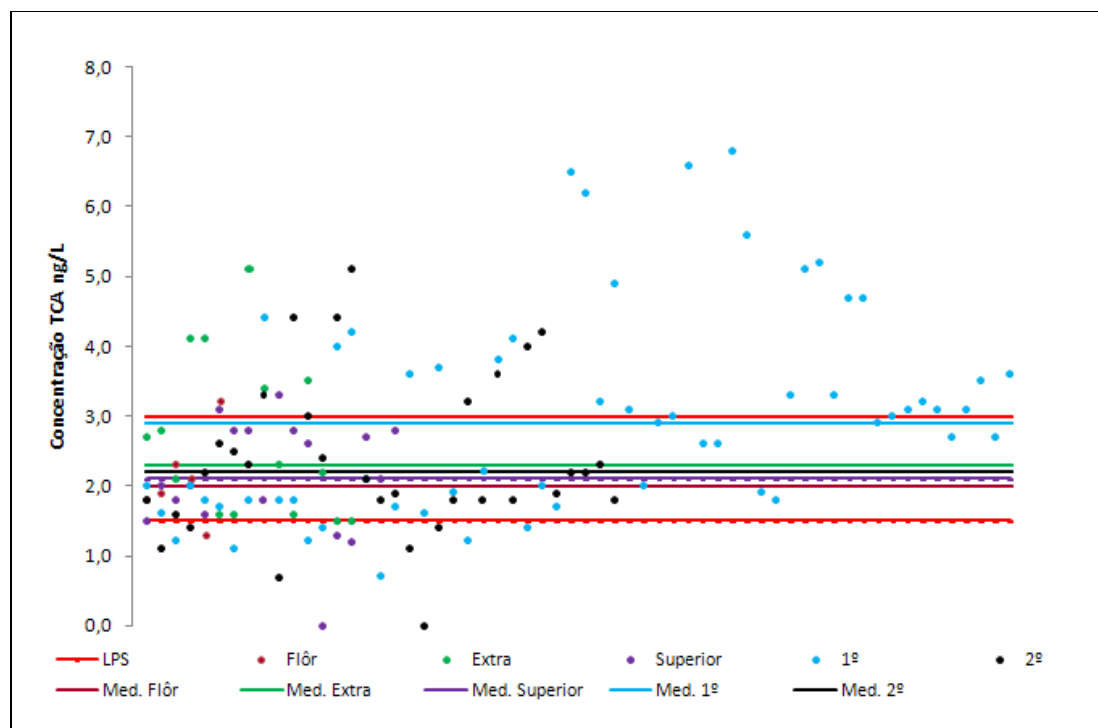
Figura 16 - Carta de Distribuição de Amostragem para F1 calibre 49x24.

Por observação da Tabela 16 e pela Figura 17, calibre 45x24, para o F2, constatou-se que todas as medianas referentes às qualidades visuais estudadas estavam dentro dos limites de percepção sensorial.

**Tabela 16 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F2 por calibre e qualidade visual**

Calibre	Qualidade Visual							Mediana/ Calibre	Mediana Global
	Flôr	Extra	Superior	1º	2º	3º	4º/5º		
45x24	2,0	2,3	2,1	2,9	2,2	-	-	2,2	2,2

Relativamente ao calibre 45x24, o valor mais baixo de TCA foi encontrado para a qualidade *Flôr* (2,0 ng/L) enquanto o valor mais elevado de TCA verificou-se para a qualidade *1º* (2,9 ng/L).



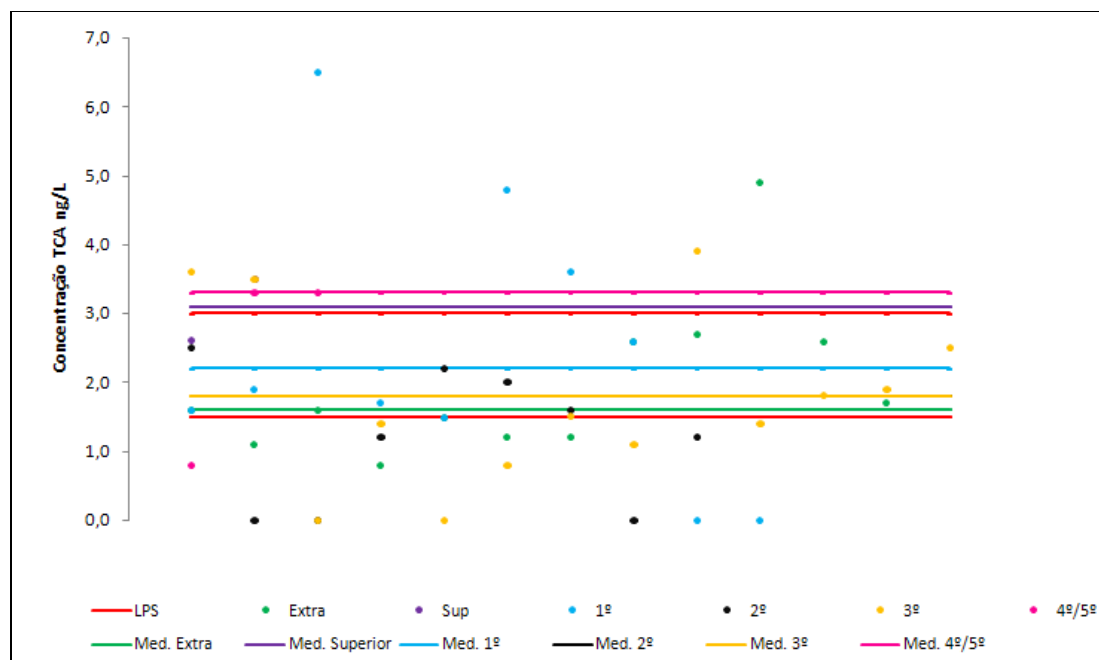
**Figura 17 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F2 calibre 45x24.**

Por observação da Tabela 17 e pela Figura 18, calibre 45x24, para o F3, constatou-se que as medianas referentes às qualidades visuais *Superior* e *4º/5º* situavam-se acima dos limites de percepção sensorial, com valores de 3,1 ng/L e 3,3 ng/L respectivamente.

**Tabela 17 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F3 por calibre e qualidade visual**

Calibre	Qualidade Visual							Mediana/ Calibre	Mediana Global
	Flôr	Extra	Superior	1º	2º	3º	4º/5º		
45x24	-	1,6	3,1	2,2	1,8	1,8	3,3	2,0	2,0

Relativamente ao calibre 45x24,o valor mais baixo de TCA foi encontrado para a qualidade *Extra* (1,6 ng/L) enquanto o valor mais elevado de TCA verificou-se para a qualidade 4º/5º (3,3 ng/L).



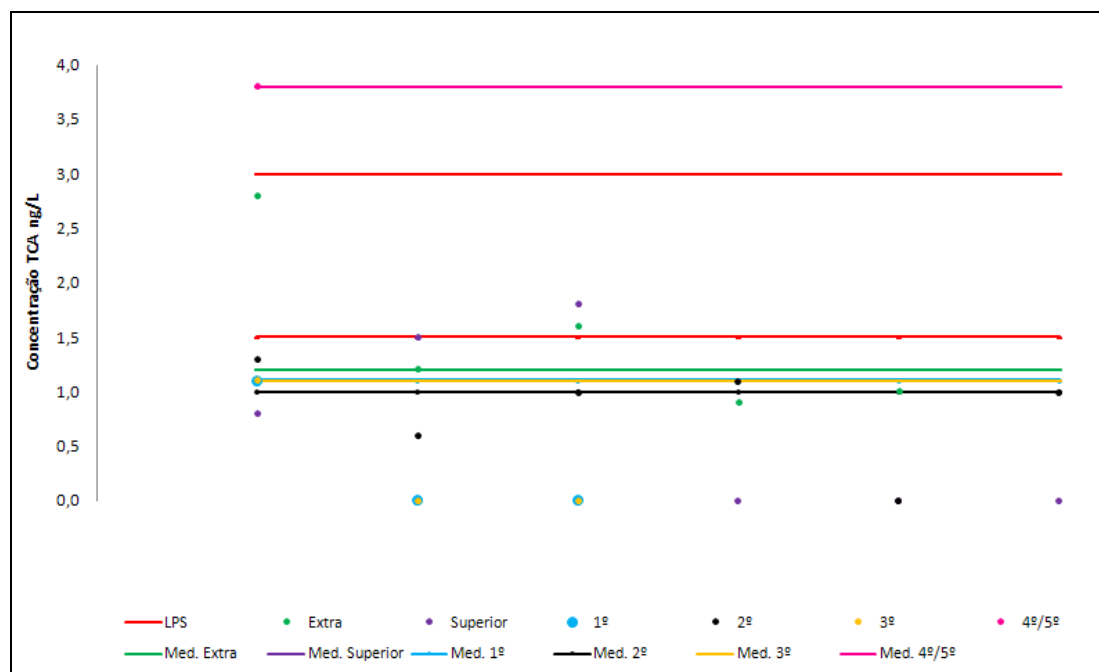
**Figura 18 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F3 calibre 45x24.**

Por observação da Tabela 18 e Figura 19, calibre 45x24 e, para o F4, constatou-se que a mediana referente à qualidade visual 4º/5º estava acima dos limites de percepção sensorial, com valor de 3,8 ng/L. Os valores para as restantes qualidades visuais situaram-se abaixo do limite inferior de percepção sensorial com excepção da qualidade *Superior* (1,5 ng/L) que possui um valor igual ao limite inferior de percepção sensorial.



**Tabela 18 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F4 por calibre e qualidade visual**

Calibre	Qualidade Visual							Mediana/ Calibre	Mediana Global
	Flôr	Extra	Superior	1º	2º	3º	4º/5º		
45x24		1,2	1,5	1,1	1,0	1,1	3,8	1,2	0,9
49x24	0,7	1,1	-	-	-	-	-	0,9	
54x24	<LOQ	0,9	-	-	-	-	-	<LOQ	



**Figura 19 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F4 calibre 45x24.**

Relativamente ao calibre 45x24, o valor mais baixo de TCA foi encontrado para a qualidade 2º (1,0 ng/L), sendo de salientar que todas as restantes qualidades, com excepção da qualidade 4º/5º apresentaram valores baixos e próximos.

Pelas Figura 20 e Figura 21, calibre 49x24 e 54x24 respectivamente e observação da Tabela 18, para o F4, constatou-se que todas as medianas referentes às qualidades visuais estudadas situaram-se abaixo dos limites de percepção sensorial.

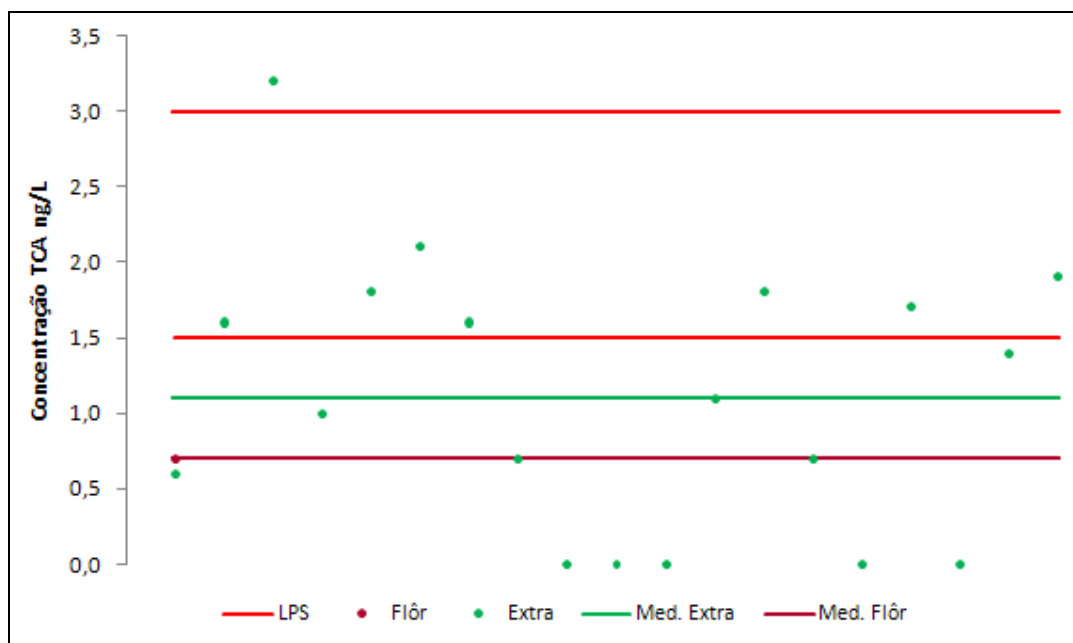


Figura 20 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F4 calibre 49x24.

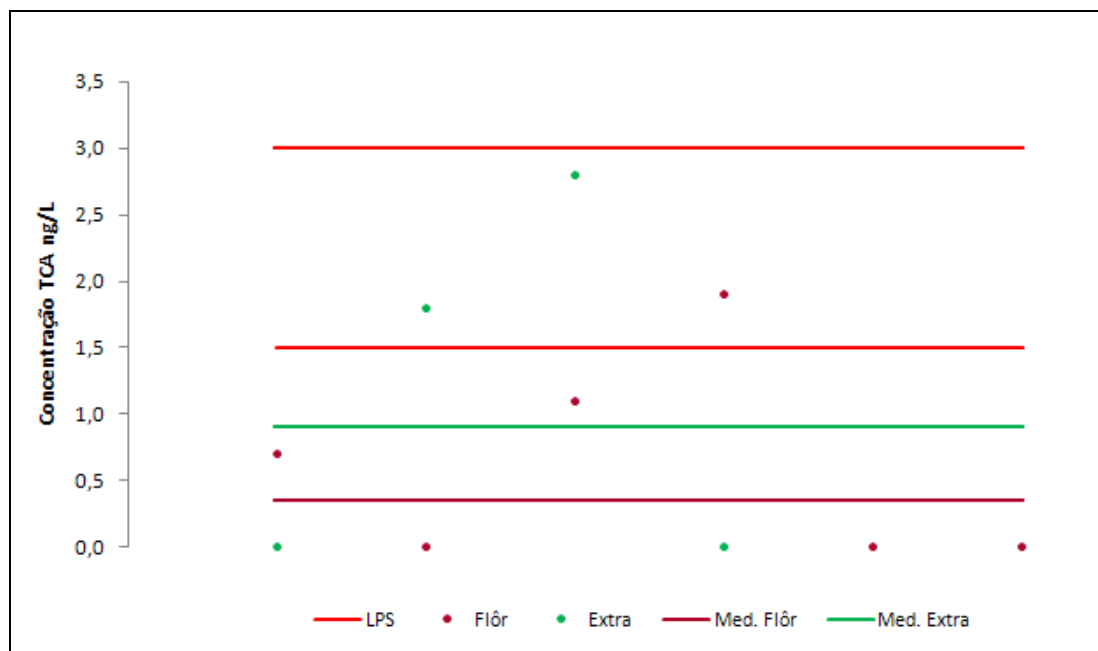


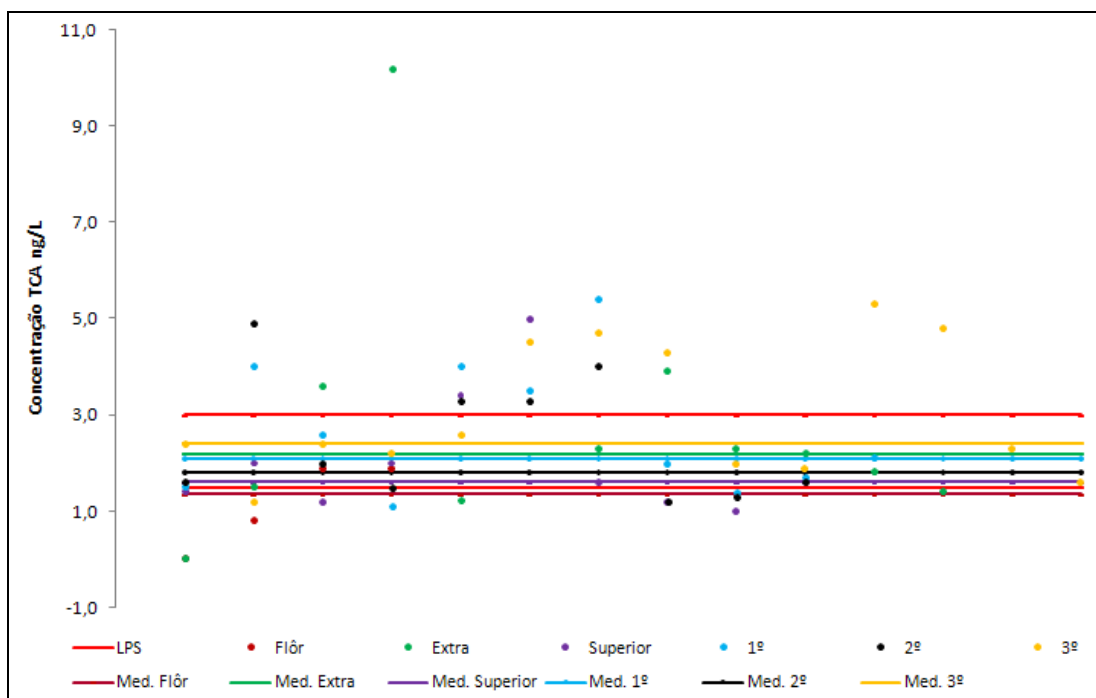
Figura 21 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F4 calibre 54x24.

Comparando iguais qualidades visuais, mas em calibres diferentes, verificou-se que os valores para o calibre de menor dimensão (45x24) eram superiores aos valores para o calibre de dimensão intermédia (49x24) e os valores deste último superiores ao calibre de maior dimensão (54x24).

Por observação da Tabela 19 e pela Figura 22, calibre 45x24, para o F5, constatou-se que todas as medianas referentes às qualidades visuais estudadas estão dentro dos limites de percepção sensorial com excepção da qualidade visual *Flôr* que se encontrou abaixo do limite inferior de percepção sensorial com um valor de 1,4 ng/L.

**Tabela 19 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F5 por calibre e qualidade visual**

Calibre	Qualidade Visual							Mediana/ Calibre	Mediana Global
	Flôr	Extra	Superior	1º	2º	3º	4º/5º		
45x24	1,4	2,2	1,6	2,1	1,8	2,4		2,0	2,0



**Figura 22 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F5 calibre 45x24.**

Relativamente ao calibre 45x24, o valor mais baixo de TCA foi encontrado para a qualidade *Flôr* (1,4 ng/L) enquanto o valor mais elevado de TCA verificou-se para a qualidade 3º (2,4 ng/L)

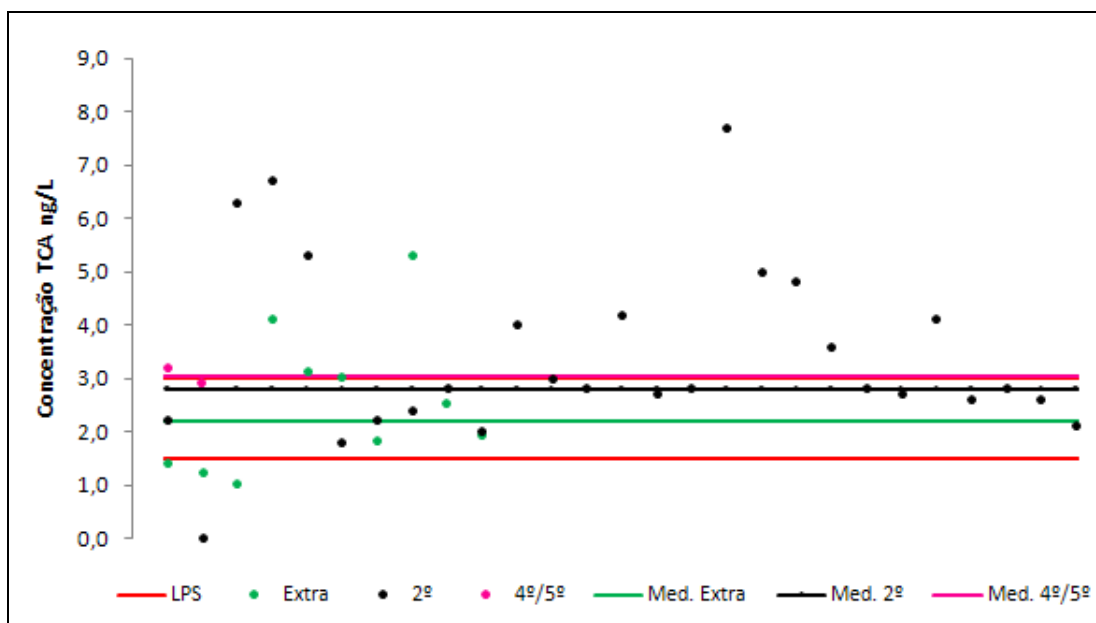
Por observação da Tabela 20, e pelas Figura 23 e Figura 24, calibre 45x24 e 49x24 respectivamente, para o F6, constatou-se que as medianas referentes às qualidades *Extra* dos dois calibres e à qualidade 2<sup>º</sup> do calibre 45x24 estavam dentro dos limites de percepção sensorial. A qualidade 4<sup>º</sup>/5<sup>º</sup> do calibre 45x24 situou-se no limite de percepção sensorial com 3,0 ng/L e a qualidade *Superior* do calibre 49x24 acima do limite de percepção sensorial (3,2 ng/L).

**Tabela 20 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F6 por calibre e qualidade visual**

Calibre	Qualidade Visual							Mediana/ Calibre	Mediana Global
	Flôr	Extra	Superior	1 <sup>º</sup>	2 <sup>º</sup>	3 <sup>º</sup>	4 <sup>º</sup> /5 <sup>º</sup>		
45x24	-	2,2	-	-	2,8	-	3,0	2,8	2,7
49x24	-	1,8	3,2	-	-	-	-	2,5	

Relativamente aos calibres, para 45x24, o valor mais baixo de TCA foi encontrado para a qualidade *Extra* (2,2 ng/L), enquanto o valor mais elevado de TCA verificou-se para a qualidade 4<sup>º</sup>/5<sup>º</sup> (3,0 ng/L). Para o 49x24 o valor mais baixo correspondeu à qualidade *Extra* (1,8 ng/L) e o valor mais elevado à qualidade *Superior* (3,2 ng/L).

Por comparação da qualidade visual *Extra* nos dois calibres, verificou-se que o valor para o calibre de menor dimensão (45x24) foi superior ao valor para o calibre de maior dimensão (49x24).



**Figura 23 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F6 calibre 45x24.**

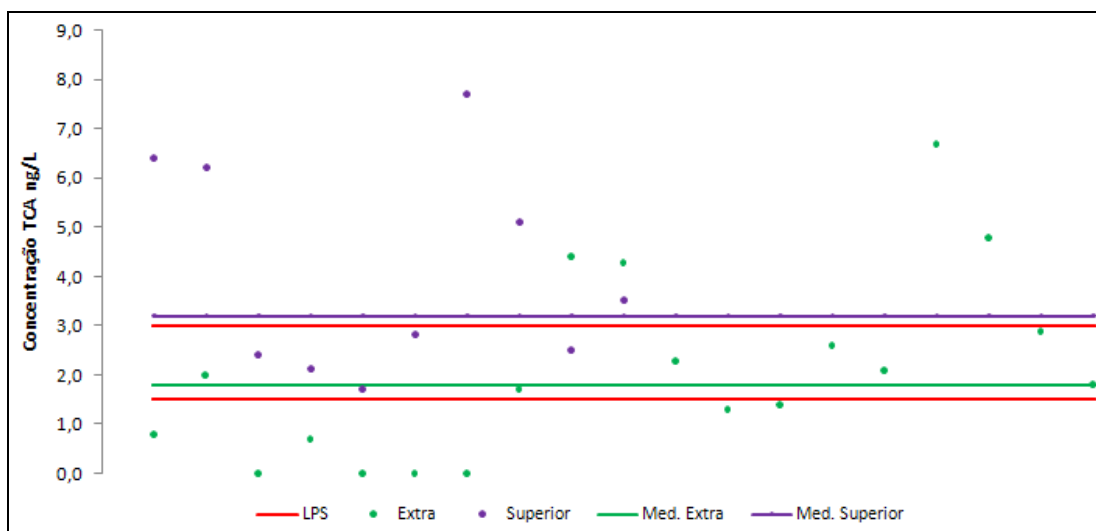


Figura 24 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F6 calibre 49x24.

Por observação da Tabela 21 e pelas Figura 25 e Figura 26, calibre 45x24 e 49x24 respectivamente, para o F7, constatou-se que as medianas referentes a todas as qualidades estavam dentro dos limites de percepção sensorial com exceção da qualidade 1ª do calibre 45x24 e qualidade *Extra* do calibre 49x24 que se situaram abaixo do limite de percepção sensorial com 1,3 ng/L e 1,4 ng/L respectivamente.

Tabela 21 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F7 por calibre e qualidade visual

Calibre	Qualidade Visual							Mediana/ Calibre	Mediana Global
	Flôr	Extra	Superior	1ª	2ª	3ª	4ª/5ª		
45x24	-	1,5	1,9	1,3	2,0	2,8	2,7	2,0	1,8
49x24	2,0	1,4						1,7	

Relativamente aos calibres, para 45x24, o valor mais baixo de TCA foi encontrado para a qualidade 1ª (1,3 ng/L), enquanto o valor mais elevado de TCA verificou-se para a qualidade 3ª (2,8 ng/L). Para o 49x24 o valor mais baixo correspondeu à qualidade *Extra* (1,4 ng/L) e o valor mais elevado à qualidade *Flôr* (2,0 ng/L).

Por comparação da qualidade visual *Extra* nos dois calibres, verificou-se que o valor para o calibre 45x24 é ligeiramente superior (1,5 ng/L) ao valor para o calibre 49x24 (1,4 ng/L).

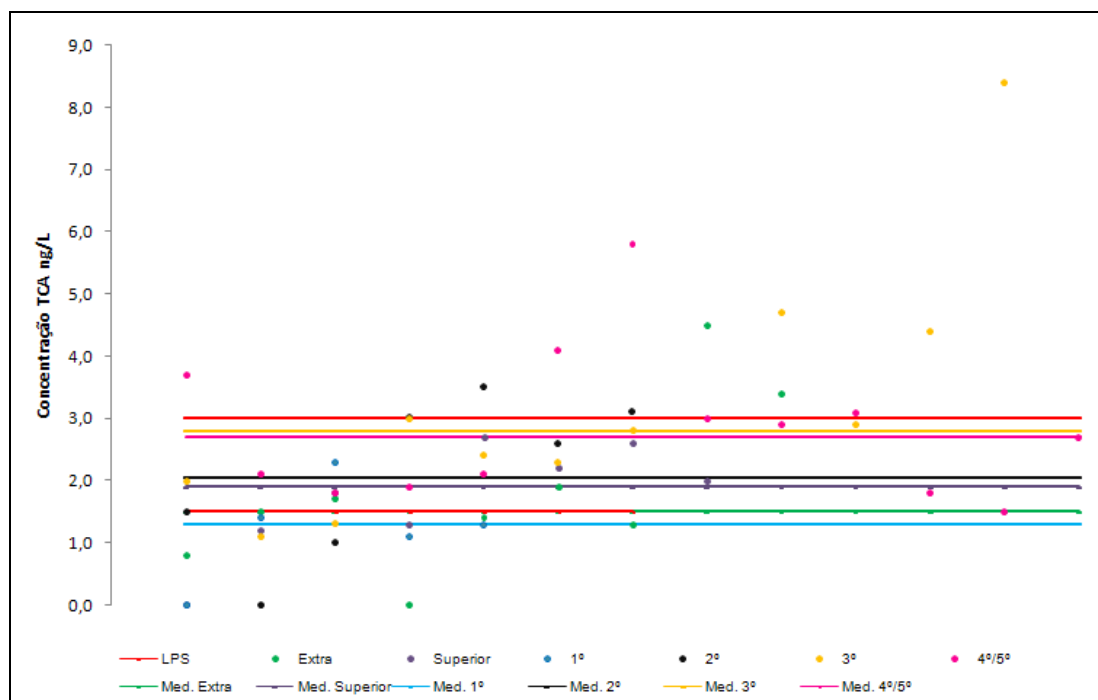


Figura 25 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F7 calibre 45x24.

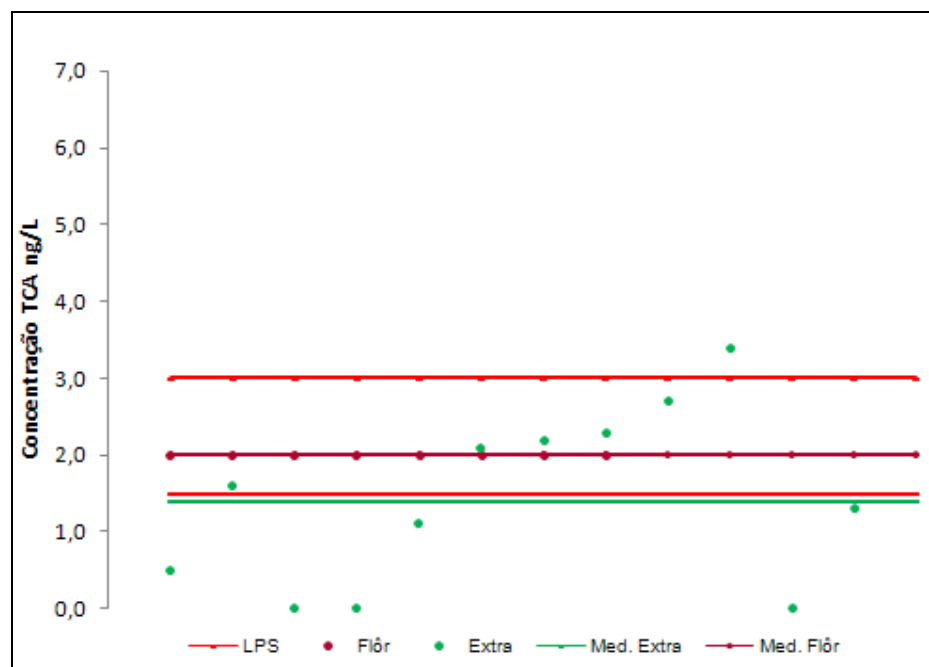
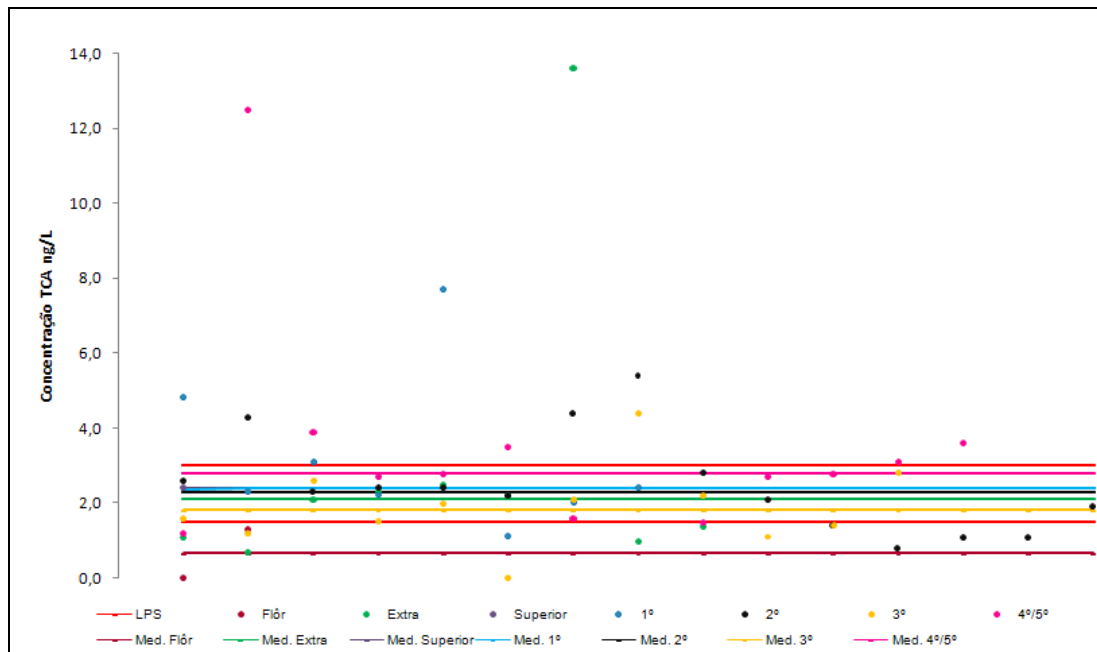


Figura 26 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F7 calibre 49x24.

Por observação da Tabela 22 e Figura 27, Figura 28 e Figura 29 para o F8, constatou-se que as medianas referentes às qualidades estudadas para o calibre 45x24 estavam dentro dos limites de percepção sensorial, com excepção da qualidade *Flôr* com um valor inferior ao limite inferior de percepção sensorial (0,7 ng/L). Quanto ao calibre 49x24, a qualidade *Superior* apresentou um valor acima do limite de percepção sensorial (3,3 ng/L), enquanto as outras qualidades, *Flôr*, *Extra* e *1º* apresentaram medianas inferiores ao limite inferior de percepção sensorial com valores 1,2 ng/L, 1,3 ng/L e 1,3 ng/L respectivamente. Relativamente ao calibre 54x24, as duas qualidades estudadas situaram-se abaixo do limite inferior de percepção sensorial com valores 0,9 ng/L para *Flôr* e 0,7 ng/L para *Extra*.

**Tabela 22 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F8 por calibre e qualidade visual**

Calibre	Qualidade Visual							Mediana/ Calibre	Mediana Global
	Flôr	Extra	Superior	1º	2º	3º	4º/5º		
45x24	0,7	2,1	2,4	2,4	2,3	1,8	2,8	2,3	0,9
49x24	1,2	1,3	3,3	1,3				1,3	
54x24	0,9	0,7						0,8	



**Figura 27 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F8 calibre 45x24.**

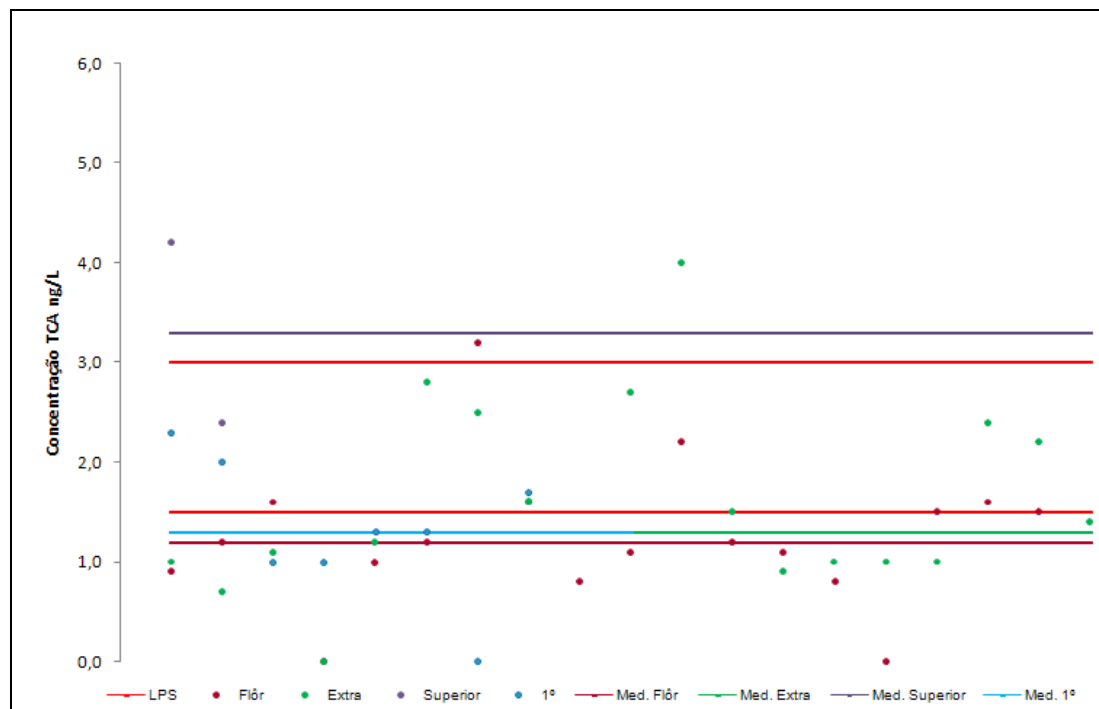


Figura 28 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F8 calibre 49x24.

Por comparação das qualidades visuais iguais, mas em calibres diferentes, verificou-se que os valores para o calibre de menor dimensão (45x24) eram superiores aos valores para o calibre de dimensão intermédia (49x24) e os valores deste último superiores ao calibre de maior dimensão (54x24). Encontrou-se uma excepção da qualidade *Extra* cujo valor mais elevado foi relativo ao calibre 49x24 e o valor mais baixo pertencente ao calibre 45x24.

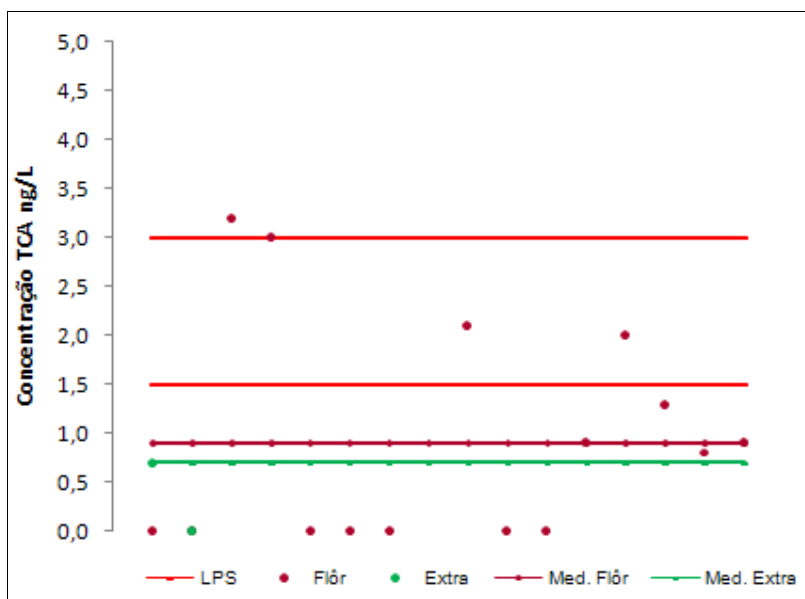


Figura 29 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F8 calibre 54x24.

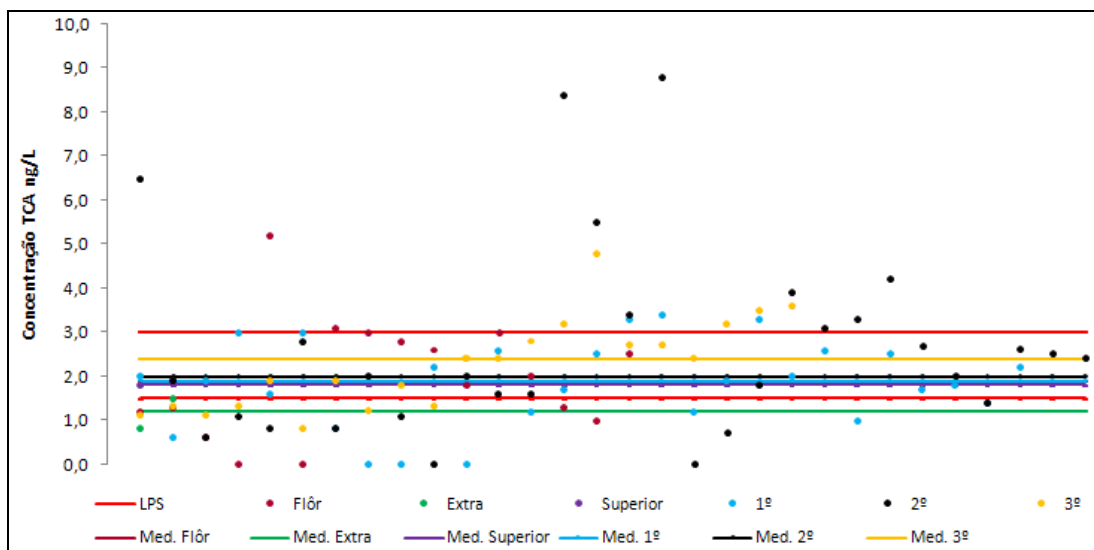


Por observação da Tabela 23, e pela Figura 30, calibre 45x24, para o F9, constatou-se que todas as medianas referentes às qualidades visuais estudadas estavam dentro dos limites de percepção sensorial com exceção da qualidade visual *Extra* que se encontrou abaixo do limite de percepção sensorial com um valor de 1,2 ng/L.

Relativamente ao calibre 45x24, o valor mais baixo de TCA foi encontrado para a qualidade *Extra* (1,2 ng/L) enquanto o valor mais elevado de TCA verificou-se para a qualidade 3ª (2,4 ng/L).

**Tabela 23 - Valores de Mediana de TCA (ng/L) para F9 por calibre e qualidade visual**

Calibre	Qualidade Visual							Mediana/ Calibre	Mediana Global
	Flôr	Extra	Superior	1ª	2ª	3ª	4ª/5ª		
45x24	1,9	1,2	1,8	1,9	2,0	2,4		1,9	1,9



**Figura 30 - Carta de Distribuição de Amostragem para o F9 calibre 45x24.**

Na Tabela 24 apresentou-se uma compilação dos valores de medianas para o TCA (ng/L) obtidos para cada fornecedor em função do calibre e da qualidade visual e que deram origem às cartas de distribuição de amostragem. Fez-se também a representação gráfica de modo a visualizar estes resultados (Gráfico 1).

**Tabela 24 – Valores de medianas para TCA em ng/L, relativos às cartas de distribuição de amostragem para Fornecedor, Calibre e Qualidade Visual**

F	Calibre	Qualidade Visual							Med/ Calibre	Med Global
		Flôr	Extra	Superior	1º	2º	3º	4º/5º		
F1	45X24	2,1	2,4	1,7	1,8	2,1	2,6		2,1	2,0
	49x24	1,9	2,0						2,0	
F2	45X24	2,0	2,3	2,1	2,9	2,2			2,2	2,2
F3	45X24		1,6	3,1	2,2	1,8	1,8	3,3	2,0	2,0
F4	45X24		1,2	1,5	1,1	1,0	1,1	3,8	1,2	0,9
	49x24	0,7	1,1						0,9	
	54X24	<LOQ	0,9						<LOQ	
F5	45X24	1,4	2,2	1,6	2,1	1,8	2,4		2,0	2,0
F6	45X24		2,2			2,8		3,0	2,8	2,7
	49x24		1,8	3,2					2,5	
F7	45X24		1,5	1,9	1,3	2,0	2,8	2,7	2,0	1,8
	49x24	2,0	1,4						1,7	
F8	45X24	0,7	2,1	2,4	2,4	2,3	1,8	2,8	2,3	1,3
	49x24	1,2	1,3	3,3	1,3				1,3	
	54X24	0,9	0,7						0,8	
F9	45X24	1,9	1,2	1,8	1,9	2,0	2,4		1,9	1,9
Med. 45x24		1,9	2,1	1,9	2,0	2,0	2,4	3,0	2,0	
Med. 49x24		1,6	1,4	3,3	1,3				1,5	
Med. 54x24		<LOQ	0,8						<LOQ	

Por observação da Tabela 24, analisando os valores de TCA das medianas para os vários calibres, constatou-se que, com a excepção da qualidade *Superior*, as qualidades *Flôr*, *Extra* e *1º* apresentam valores de TCA mais baixos para o calibre 54x24 e mais elevados para o calibre 45x24.

Analisando os calibres por fornecedor, os valores de TCA das medianas (Med/Calibre), independente das qualidades, apresentam-se a diminuir no sentido do menor para o maior calibre, isto é, o calibre 45x24 apresenta os valores mais elevados de medianas de TCA, seguido do calibre 49x24 e por fim o 54x24 com os valores mais baixos.

Observando as medianas globais e o Gráfico 1, consegue hierarquizar-se os fornecedores de modo a classificá-los relativamente ao TCA das suas rolhas. O fornecedor com valor mais baixo é o F4, seguido do F8, ambos com valores de medianas globais inferiores ao limite inferior de percepção sensorial. Em seguida, o F7 e o F9, com valores abaixo de 2,0 ng/L e o F1, o F3 e o F5 com valores iguais (2,0 ng/L). Por fim o F2 e o F6, sendo este último o que apresenta o valor mais alto (2,7 ng/L) perto do limite máximo de percepção sensorial.

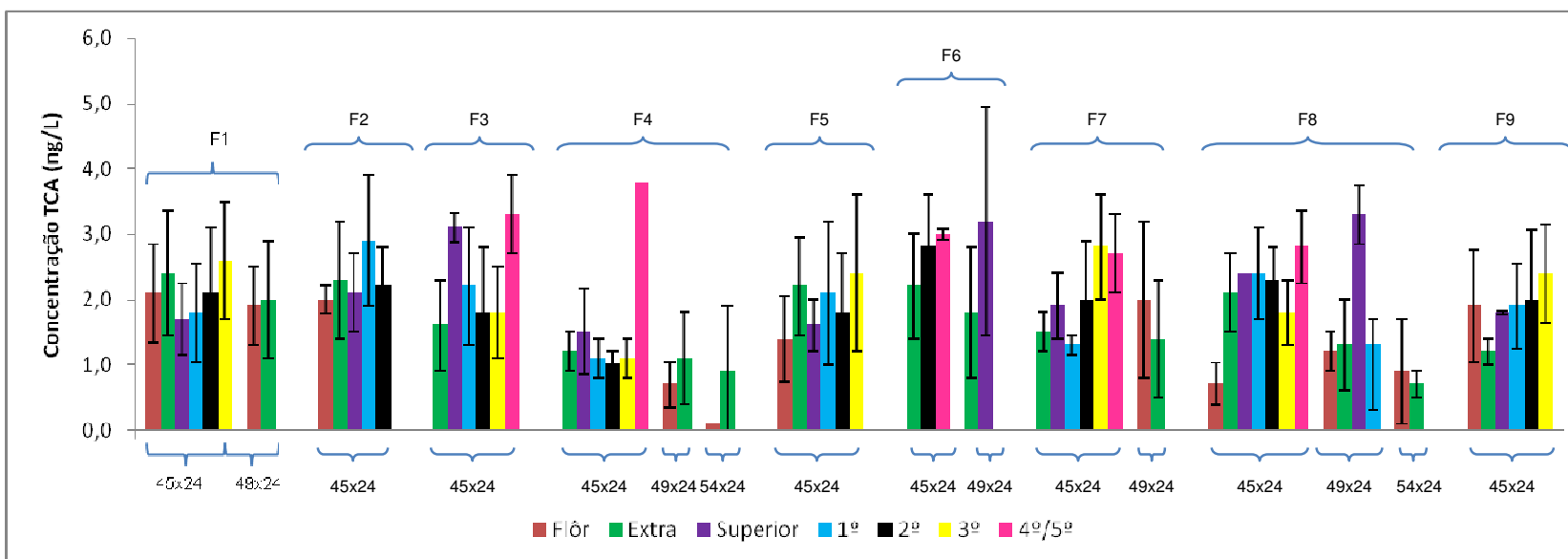


Gráfico 1 - Gráfico demonstrativo dos valores medianos de TCA por Fornecedor, Calibre e Qualidade

Com o intuito de aferir sobre as percentagens de rejeição dos lotes dos fornecedores, e concluir sobre a hierarquização dos fornecedores criou-se uma tabela (Tabela 25) onde constam as percentagens acima, entre e abaixo dos limites de percepção sensorial. Esta tabela foi criada a partir de todos os valores individuais obtidos para quantificação do TCA em ng/L, recorrendo a tabelas de frequência (Anexo 1).

**Tabela 25 - Percentagens relativas aos valores de mediana de TCA menores, iguais e superiores aos limites de percepção sensorial por fornecedor, calibre e qualidade.**

F	Calibre	Qualidade Visual																				
		Flôr			Extra			Superior			1º			2º			3º			4º/5º		
		<LPS	LPS	>LPS	<LPS	LPS	>LPS	<LPS	LPS	>LPS	<LPS	LPS	>LPS	<LPS	LPS	>LPS	<LPS	LPS	>LPS	<LPS	LPS	>LPS
F1	45X24	41,0	48,7	10,3	25,2	45,8	29,0	50,9	37,8	11,3	37,3	43,3	19,4	31,8	40,0	28,2	19,2	35,9	44,9	-	-	-
	49X24	57,1	28,6	14,3	31,3	43,7	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	45X24	16,7	66,6	16,7	0	66,7	33,3	16,7	72,2	11,1	11,9	44,0	44,1	18,2	57,6	24,2	-	-	-	-	-	-
F3	45X24	-	-	-	33,3	58,4	8,3	0	50,0	50,0	20,0	50,0	30,0	55,6	44,4	0	46,2	30,7	23,1	33,3	0	66,7
F4	45X24	-	-	-	60,0	40,0	0	66,7	33,3	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	100
	49X24	100	0	0	57,9	36,8	5,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	54X24	83,3	16,7	0	50,0	50,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F5	45X24	50,0	50,0	0	27,3	45,4	27,3	44,4	33,4	22,2	18,2	45,4	36,4	20,0	40,0	40,0	7,1	57,2	35,7	-	-	-
F6	45X24	-	-	-	30,0	40,0	30,0	-	-	-	-	-	-	3,7	59,3	37,0	-	-	-	0	50,0	50,0
	49X24	-	-	-	42,1	36,8	21,1	0	50,0	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7	45X24	-	-	-	44,4	33,4	22,2	37,5	62,5	0	80,0	20,0	0	28,6	42,8	28,6	18,2	54,5	27,3	0	69,2	30,8
	49X24	46,2	38,4	15,4	50,0	41,7	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F8	45X24	100	0	0	44,4	44,5	11,1	0	100	0	12,5	50,0	37,5	26,7	53,3	20,0	33,3	58,4	8,3	8,3	50,0	41,7
	49X24	61,1	33,3	5,6	55,6	38,8	5,6	0	50,0	50,0	62,5	37,5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	54X24	73,3	20,0	6,7	100	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9	45X24	43,8	43,7	12,5	50,0	50,0	0	0	100	0	32,1	57,2	10,7	30,0	40,0	30,0	33,3	42,9	23,8	-	-	-

Por análise da Tabela 25, para o calibre 45x24 e qualidade *Flôr*, o F8 foi o que obteve o melhor resultado, 100% abaixo do limite inferior de percepção sensorial. Para o mesmo calibre e qualidade *Extra*, o F4 foi o que apresentou melhor resultado, pois além de não ter qualquer valor acima do limite superior de percepção sensorial, apresentou 60% abaixo do limite inferior de percepção sensorial e 40% entre os limites de percepção sensorial. Para 45x24 *Superior*, o F4 apresentou o melhor resultado mais uma vez sem qualquer valor acima do limite de percepção sensorial, apresentando 66,7% abaixo do limite inferior e 33,3% entre os limites de percepção sensorial. Para 45x24 1º, 2º e 3º o F4 apresentou os melhores resultados, nenhum valor acima do limite de percepção sensorial e 100% abaixo dos mesmos limites. Quanto ao 45x24 4º/5º, o F7 e o F8 apresentaram os melhores resultados. Apesar de o F8 ter uma percentagem acima do limite de percepção sensorial superior ao F7, possui 8,3% abaixo dos limites de percepção sensorial que o F7 não possui.

Relativamente ao calibre 49x24 e qualidade *Flôr*, o F4 apresentou o melhor resultado, 0% para valores acima do limite superior de percepção sensorial e 100% abaixo do limite inferior de percepção sensorial. Para 49x24 *Extra*, o F4 e o F8 apresentaram os melhores resultados com percentagens acima do limite superior de percepção sensorial baixas (5,3% e 5,6% respectivamente). Para 49x24 *Superior*, o F6 e o F8 foram os únicos a fornecer esta combinação de calibre e qualidade, tendo resultados iguais. Para 49x24 1º, o F8 é o único fornecedor com este calibre associado a esta qualidade visual, não apresentou qualquer valor acima do limite superior de percepção sensorial.

Quanto ao calibre 54x24 *Flôr*, o F4 é o que apresenta melhor resultado sem nenhum valor acima do limite superior de percepção sensorial e com 83,3% de valores abaixo do limite inferior de percepção sensorial. Para o 54x24 *Extra*, o F8 foi o que apresentou melhor resultado com todos os valores abaixo do limite de percepção.

Sendo assim, e após uma análise conseguida através dos valores de TCA individuais pode dizer-se que o melhor fornecedor no ano de 2007 foi o F4 seguido do F8.

## **4. Conclusões**

---

Com base na norma ISO/CD 20752.2 relativa à determinação do TCA libertável, foi implementado numa indústria corticeira uma metodologia para quantificar o TCA por HS-SPME/GC-ECD. Numa primeira fase, foram otimizados vários parâmetros analíticos desta metodologia: gama de linearidade, LOD e LOQ, repetibilidade e reprodutibilidade e precisão intermédia. O estudo da linearidade de resposta permitiu observar uma boa linearidade ( $R^2 = 0,9964$ ) para a gama de concentrações testada (0,63 – 16,75 ng/L). A determinação dos limiares analíticos permitiu obter valores de 0,21 e 0,63 ng/l para o LOD e LOQ respectivamente, este último corresponde ao padrão de calibração de menor concentração. O estudo das condições de repetibilidade e reprodutibilidade da metodologia HS-SPME/GC-ECD aplicada permitiu obter coeficientes de variação de 1% e 2% respectivamente. Relativamente ao estudo da robustez do método, o desvio padrão de precisão intermédia para as concentrações estudadas 3,18 e 9,90 ng/L foi de 1,2% e 0,74% respectivamente. Sendo assim, a validação do método permitiu verificar que este se mostrou adequado para controlar o parâmetro em causa (quantificação do TCA) dentro da gama pretendida.

O presente trabalho tentou verificar a existência de relações entre a quantidade de TCA presente nas rolhas de cortiça e alguns parâmetros de classificação (qualidade visual, calibre e fornecedores). Pode concluir-se que os valores mais baixos de TCA estão associados às qualidades visuais Flôr e Extra e calibres superiores. Ou seja, uma qualidade Flôr de 54x24 tem um valor de TCA mais baixo que uma Flôr de 49x24 e este mais baixo do que uma Flôr de 45x24. Relativamente aos fornecedores, é evidente a contribuição significativa deste parâmetro. Verificou-se que existe uma tendência clara para os valores de TCA estarem relacionados com o fornecedor. Pode dividir-se os fornecedores em três grupos: fornecedores que apresentam valores baixos de TCA para todas as qualidades visuais e calibres, fornecedores que apresentam valores altos de TCA para todas as qualidades visuais e calibres e os fornecedores que apresentam valores intermédios de TCA para todas as classes visuais e calibres. O fornecedor que apresentou valores mais baixos de TCA foi o F4. O que apresentou valores mais elevados foi o F6. Os restantes fornecedores apresentam valores medianos. Um estudo continuado dos fornecedores permitiria construir uma base de dados dos mesmos com o intuito de os avaliar e seleccionar. Podia conseguir-se um maior rendimento a nível de aprovações por TCA, uma vez que saber-se-ia previamente quais os fornecedores em condições de oferecer um bom produto sem problemas de TCA. Os fornecedores menos bons tentariam melhorar os seus procedimentos a nível de armazenamento, manuseamento e produção das rolhas e melhorarem continuamente os seus processos.

Este estudo indica que para o ano de 2007 existe uma relação entre o teor de TCA e a qualidade visual, calibre e o fornecedor das rolhas de cortiça. A confirmação da tendência verificada deve ser consolidada por análise de rolhas de cortiça ao longo de vários anos. Caso se verificarem as ditas tendências para os parâmetros estudados, estes podem ser considerados parâmetros de qualidade. Fazendo uma escolha criteriosa aliada a uma combinação adequada dos vários parâmetros, estes conjugar-se-iam em harmonia, evitando custos desnecessários conseguindo-se maior produtividade.

## **5. Bibliografia**

---



- 1 M. A. Fortes; E. Rosa; H. Pereira: “A Cortiça”, Lisboa, IST, Instituto Superior Técnico Press 2004.
- 2 S. P. Silva; M. A. Sabino; E. M. Fernandes; V. M. Correlo; L. F. Boesel; R. L. Reis: “Cork: properties, capabilities and applications”, International Materials Reviews 2005.
- 3 J. Graça: “Os tipos de cortiça e os produtos da sua transformação industrial”, Departamento de Engenharia Florestal, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- 4 P. V. Neto: “Cortiça. Tecnologia Corticeira – 1º ano”, Colecção aprendizagem profissional. Edição IEFP 1994.
- 5 Cork Information Bureau, 2006.
- 6 F. Cumbre; F. Lopes; H. Pereira: “The effect of water boiling on annual ring width and porosity of cork”, Wood Fiber Sci. 32 (1), 125-133, 2000.
- 7 S. M. Rocha; M. A. Coimbra; I. Delgadillo: “Demonstration of pectin polysaccharides in cork cell wall from *Quercus suber* L”, J. Agric. Food Chem. 48, 2003-2007, 2000.
- 8 <http://www.apcor.pt/artigo.php?art=267>, Setembro 2008.
- 9 P. V. Neto: “Compostos voláteis associados a defeitos de cortiça de *Quercus suber* L.: Estudo dos efeitos de matriz por micro-extracção em fase sólida na região de espaço de cabeça”, Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2005.
- 10 H. Pereira: “Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L.”, Wood Sci. Technol. 22, 211–218, 1988.
- 11 S. Rocha: “Estudo da composição química, da estrutura celular e dos componentes voláteis da cortiça de *Quercus suber* L. I – Em função de ataques microbiológicos. II – Em função do processo de autoclavagem”, Tese de doutoramento, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 1997.
- 12 P. E. Kolattukudy: “Polyesters in higher plants. Advances in biochemical engineering / biotechnology”, Biopolyesters, vol. 71. Berlin, Heidelberg, Springer 1–49, 2001.
- 13 P. E. Kolattukudy; K. E. Espelie: “Chemistry, biochemistry, and function of suberin and associate waxes. Natural products of woody plants, chemical extraneous to the lignocellulosic cell wall”, Berlin, Heidelberg, Springer 304–67, 1989.
- 14 P. E. Kolattukudy: “Bio-polyester membranes of plants—Cutin and suberin”, Science, 208 (4447), 990–1000, 1980.
- 15 M. A. Bernards: “Demystifying suberin”, Can. J. Bot. 80 (3), 227–40, 2002.
- 16 A. Gandini; C. P. Neto; A. J. D. Silvestre: “Suberin: A promising renewable resource for novel macromolecular materials”, Prog. Polym. Sci. 31, 878-892, 2006.
- 17 S. M. Rocha; B. J. Goodfellow; I. Delgadillo; C. P. Neto; A. M. Gil: “Enzymatic isolation and structural characterization of polymeric suberin of cork from *Quercus suber* L.”, Int. J. Biol. Macromol. 28, 107–119, 2001.

- 18 C. Pascoal Neto; D. Evtuguin: "Química de Materiais Lenhocelulósicos na Universidade de Aveiro: Breve investigação de uma década de investigação", CICECO e Departamento de Química, Universidade de Aveiro.
- 19 M. Lopes; A. M. Gil; A. J. D. Silvestre; C. Pascoal Neto: "Composition of suberin extracted upon gradual alkaline methanolysis of *Quercus suber* cork", J. Agric. Food Chem. 48, 383-91, 2000.
- 20 N. M. A. Cordeiro: "Fraccionamento da cortiça e caracterização dos seus componentes. Estudo de possibilidades de valorização da suberina", Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 1998.
- 21 S. Santos; J. Rodrigues; J. Graça: "Variabilidade da Composição Química da Suberina de Cortiças Amadias de Várias Origens Geográficas", Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Engenharia Florestal, Instituto de Investigação Científica Tropical, Centro de Estudos de Tecnologia Florestal, Lisboa.
- 22 M. A. Bernards: "The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm", Phytochemistry 47 (6), 915-33, 1998.
- 23 M. A. Bernards; F. A. Razem: "The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall bio-polymer", Phytochemistry 57 (7), 1115-22, 2001.
- 24 M. A. Bernards; M.L. Lopez; J. Zajicek; N. G. Lewis: "Hydrocynamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin", J. Biol. Chem. 270 (13), 7382-6, 1995.
- 25 C. Lapierre; B. Pollet; J. Negrel: "The phenolic domain of potato suberin: Structural comparison with lignins", Phytochemistry 42 (4), 949-53, 1996.
- 26 O. Borg-Olivier; B. Monties: "Lignin, suberin, phenolic acids and tyramine in the suberized, wound-induced potato periderm", Phytochemistry 32 (3), 601-606, 1993.
- 27 M. Lopes; C. Pascoal Neto; D. Evtuguin; A. J. D. Silvestre; A. Gil; N. Cordeiro: "Products of the permanganate oxidation of cork, desuberized cork, suberin and lignin from *Quercus suber* L.", Holzforschung 52 (2), 146-148, 1998.
- 28 N. M. A. Cordeiro; M. N. Belgacem; A. J. D. Silvestre; C. P. Neto; A. Gandini: "Cork suberin as a new source of chemicals. 1. Isolation and chemical characterization of its composition", Int. J. Biol. Macromol. 22, 71-80, 1998.
- 29 N. M. A. Cordeiro; M. N. Belgacem; C. P. Neto; A. Gandini: "Cork suberin as a new source of chemicals. 2. Crystallinity, thermal and rheological properties", Bioresource Technol. 63, 153-158, 1998.
- 30 A. M. Gil; M. Lopes; J. Rocha; C. Pascoal Neto: "A <sup>13</sup>C solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy study of cork cell wall structure: the effect of suberin removal", Int. J. Biol. Macromol. 20, 293-605, 1997.

- 31 C. Pascoal Neto; N. Cordeiro; A. Seca; F. Domingues; A. Gandini; D. Robert: "Isolation and characterization of a ligninpolymer of the cork of *Quercus suber* L.", *Holzforschung* 50 (6), 563–568 1996.
- 32 F. Carrapiço: "A estratégia evolutiva de ocupação do meio aéreo e o aparecimento de novas vias bioquímicas", Departamento de Biologia Vegetal, Secção de Biologia Celular e Biotecnologia Vegetal, 2001.
- 33 V. Castola; A. Bighelli; S. Rezzi; G. Melloni; S. Gladiali; J.-M. Desjobert; J. Casanova: "Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.)", *Ind. Crops Prod.* 15, 15–22, 2002.
- 34 R. F. Chandler; S. N. Hooper: "Friedelin and associated triterpenoids", *Phytochemistry* 18 (5), 711–724, 1979.
- 35 V. V. Kane; R. Stevenson: "Friedelin and Related Compounds. The Isolation of Friedelane-2,3-dione from Cork Smoker Wash Solids", *J. Org. Chem.* 25 (8), 1394–1396, 1960.
- 36 S. Varea; M. C. García-Vallejo; E. Cadahía; B. F. d. Simón: "Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine", *Eur. Food Res. Technol.* 213, 56–61, 2001.
- 37 E. Conde; E. Cadahía; M. C. García-Vallejo; B. F. d. Simón; J. R. G. Adrados: "Low Molecular Weight Polyphenols in Cork of *Quercus suber*", *J. Agric. Food Chem.* 45, 2695–2700, 1997.
- 38 E. Conde; E. Cadahía; M. C. García-Vallejo; B. F. d. Simón: "Polyphenolic Composition of *Quercus suber* Cork from Different Spanish Provenances", *J. Agric. Food Chem.* 46, 3166–3171, 1998.
- 39 L. Gil: "Cortiça – Produção, Tecnologia e Aplicação", Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, 1998.
- 40 E. Cadahía; E. Conde; B. F. d. Simón; M. C. García-Vallejo: "Changes in Tannic Composition of Reproduction Cork *Quercus suber* throughout Industrial Processing", *J. Agric. Food Chem.* 45, 2332–2336, 1998.
- 41 S. Rocha; I. Delgadillo; A. J. F. Correia: "GC-MS study of volatiles of normal and microbiologically attacked cork from *Quercus suber* L.", *J. Agric. Food Chem.* 44 (3), 865–871, 1996.
- 42 V. Mazzoleni; P. Caldentey; M. Careri; A. Mangia; O. Colagrande: "Volatile components of cork used for production of wine stoppers", *Am. J. Enol. Viticult.* 45 (4), 401–406, 1994.
- 43 H. Pereira: "Cortiça", *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais* 550, 244–247, 1984.
- 44 N. Boudaoud; L. Eveleigh: "Comparative study of the aromatic profile of different kinds of wine cork stoppers", *J. Agric. Food Chem.* 51, 1530–1533, 2003.
- 45 S. Insa; V. Salvadó; E. Anticó: "Assays on the simultaneous determination and elimination of chloroanisoles and chlorophenols from contaminated cork samples", *J. Chromatogr. A* 1047, 15–20, 2004.

- 46 R. Juanola; L. Guerrero, D. Subirá; V. Salvador; S. Insa; J. A. Garcia Regueiro; E. Antico: "Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork stoppers", *Anal. Chim. Acta* 513, 291–297, 2004.
- 47 V. Mazzoleni; P. Caldentey; A. Silva: "Phenolic Compounds in Cork Used for Production of Wine Stoppers as Affected by Storage and Boiling of Cork Slabs", *Am. J. Enol. Viticult.* 49 (1), 6–10, 1998.
- 48 M. Riu; M. Mestres; O. Busto; J. Guasch: "Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection", *J. Chromatogr. A* 977, 1-8, 2002.
- 49 M. Riu; M. Mestres; O. Busto; J. Guasch: "Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection", *J. Chromatogr. A* 1107, 240-247, 2006.
- 50 L. Culleré; J. Cacho; V. Ferreira: "Comparative study of the aromatic profile of different kinds of wine cork stoppers", *Food Chem.* 112, 381–387, 2009.
- 51 V. Castola; B. Marongiu; A. Bighelli; C. Floris; A. Lai; J. Casanova: "Extractives of cork (*Quercus suber* L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO<sub>2</sub> extracts", *Ind. Crops Prod.* 21, 65–69, 2005.
- 52 Ó. Ezquerro; M. T. Tena: "Determination of odour-causing volatile organic compounds in cork stoppers by multiple headspace solid-phase microextraction", *J. Chromatogr. A.* 1068, 201-208, 2005.
- 53 CIPR, Confédération Européenne du Liège, Versão 5, 2006.
- 54 <http://www.naturlink.pt/canais/Artigo.asp?iArtigo=11423&iLingua=>, Janeiro 2009.
- 55 C. Silva Pereira; P. Danesh; J. J. F. Marques; M. V. San Romão: "O gosto a rolha em vinhos. Estado actual dos conhecimentos", *Ciência Téc. Vitiv.* 14 (2), 79-99, 1999.
- 56 F. Lopes; H. Pereira: "Definition of quality classes for champagne cork stoppers in the high quality range", *Wood Sci. Technol.* 34, 3–10, 2000.
- 57 M. Borges; C. Cunha: *Boletim da Junta Nacional de Cortiça*, 565, 678–679, 1985.
- 58 Kit Técnico sobre Rolhas de Cortiça, Apcor 2004.
- 59 H. Pereira: "Cork. Biology, Production and Uses", Elsevier, 2007.
- 60 T. J. Evans; C. E. Butzke, S. E. Ebeler: "Detection of cork taint in wine using automated solid-phase microextraction in combination with GC/MS-SIM", *ACS Symp. Ser.* 714, 208-216, 1999.
- 61 P. Duerr: "Wine Quality Evaluation", *Proceedings of the international symposium on cool climate viticulture and enology*, 1985.
- 62 R. Juanola; D. Subirà; V. Salvadó; J. A. Garcia Regueiro; E. Anticó: "Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine", *Europ. Food Research Technol.* 220 (3-4), 347-352, 2005.

- 63 A. S. Allard; M. Remberger; A. H. Neilson: "Bacterial O- methylation of halogen-substituted phenols", Appl. Environ. Microbiol. 53, 839-845, 1987.
- 64 A. J. Cserjesi; E. L. Johnson: "Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*", Can. J. Microbiol. 18, 45-49, 1972.
- 65 A. H. Neilson; C. Lindgren; P.A. Hynning; M. Remberger: "Methylation of halogenated phenols and thiophenols by cell extracts of gram-positive and gram-negative bacteria", Appl. Environ. Microbiol. 54, 524-530, 1988.
- 66 D. L. Capone; G. K. Skouroumounis; D. A. Barker; H. J. McLean; A. P. Pollnitz; M. A. Sefton: "Absorption of chloroanisoles from wines by corks and other materials", Austr. J. Grape Wine Research, 5, 91-98, 1999.
- 67 D. A. Barker; D. L. Capone; A. P. Pollnitz; H. J. McLean; I. L. Francis; H. Oakey; M. A. Sefton: "Absorption of 2,4,6-Trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment", Austr. J. Grape Wine Research, 7, 40-46, 2001.
- 68 Anónimo: "Quantitative experiments to determine the components responsible and eliminate the causes of undesirable sensory characteristics in drinks stoppered with cork", Sta. Maria de Lamas. Ed. CELiège, 1996.
- 69 H. R. Buser; C. Zanier; H. Tanner: "Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine", J. Agric. Food Chem. 30 (2), 359-362, 1982.
- 70 P. Chatonnet; D. Labadie; S. Boutou: "Simultaneous assay of chlorophenols and chloroanisoles in wines and corks or cork based stoppers – Application in determining the origin of pollution in bottled wines", J. Int. Sci. Vigne Vin 37 (3), 181-193, 2003.
- 71 A. Pena-Neira; B. F. de Simon; M.C. Garcia.Vallejo; T. Hernandez; E. Cadahia; J. A. Suarez: "Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers", Europ. Food Research Technol. 211 (4), 257-261, 2000.
- 72 A. P. Pollnitz; K. H. Pardon; D. Liacopolus; G. K. Skouroumounis; M. A. Sefton: "The analysis of 2,4,6-Trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks", Austr. J. Grape Wine Research, 2, 184-190, 1996.
- 73 S. Insa; E. Anticó; V. Ferreira: "Highly selective solid-phase extraction and large volume injection for the robust gas chromatography-mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines", J. Chromatogr. A 1089 (1-2), 235–242, 2005.
- 74 N. Sanvicens; E. J. Moore; G. G. Guillaullt; M. P. Marco: "Determination of haloanisols in white wine by immunosorbent solid-phase extraction followed by enzyme-linked immunosorbent assay", J. Agric. Food Chem. 54, 9176-9183, 2006.
- 75 G. J. Soleas; J. Yan; T. Seaver; D. M. Goldberg: "Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potencial cause of cork taint", J. Agric. Food Chem. 50 (5), 1032-1039, 2002.

- 76 E. Carasek; E. Cudjoe; J. Pawliszyn: "Fast and sensitive method to determine chloroanisoles in cork using an internally cooled solid-phase microextraction fiber", *J. Chromatogr. A* 1138 (1-2), 10, 2007.
- 77 R. M. Callejon; A. M. Trancoso; M. L. Morales: "Analysis for chloroanisoles and chlorophenols in cork by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry", *Talanta* 71 (5), 2092, 2007.
- 78 A. Zalacain; G. L. Alonso; C. Lorenzo; m. Iniguez; M.R. Salinas: "Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint", *J. Chromatogr. A* 1033 (1), 173-178, 2004.
- 79 N. Boudaoud; L. Eveleigh: "A new approach to the characterization of volatile signatures of cork wine stoppers", *J. Agric. Food Chem.* 51 (6), 1530-1533, 2003.
- 80 J.L. Gomez-Ariza; T. Garcia-Barrera; F. Lorenzo; R. Beltran: "Use of multiple headspace solid-phase microextraction and pervaporation for the determination of off-flavours in wine", *J. Chromatogr. A* 1112 (1-2), 133, 2006.
- 81 M.K. Taylor; T. M. Young; C. E. Butzke; S. E. Ebeler: "Supercritical fluid extraction of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers", *J. Agric. Food Chem.* 48 (6), 2208-2211, 2000.
- 82 M. L. Álvarez-Rodríguez; L. López-Ocaña; J. M. López-Coronado; E. Rodríguez; M. J. Martínez; G. Larriba; J. J. R. Coque: "Cork taint of wines: Role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O-methylation of 2,4,6-trichlorophenol", *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5860-5869, 2002.
- 83 C. L. Arthur; J. Pawliszyn: "SPME with thermal desorption using fused silica optical fibers", *Anal. Chem.* 62, 2145-2148, 1990.
- 84 Z. Zhang; M. J. Yang; J. Pawliszyn: "SPME. A solvent-free alternative for sample preparation", *Anal. Chem.* 66, 844A-854A, 1994.
- 85 J. Pawliszyn: "Solid Phase Microextraction: Theory and Practice", Wiley-VCH, New York, 1997.
- 86 H.L. Lord, J. Pawliszyn: "Recent Advances in Solid-Phase Microextraction", *LC-GC May supplement*, S41-S46, 1998.
- 87 J. Pawliszyn: "Applications of Solid Phase Microextraction", Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- 88 J. M. Riboulet; L. A. R. Alves; N. Urreizti: "Quantificação dos Cloroanisóis por Micro Extracção em Fase Sólida (Spme) e Cromatografia Gasosa (Gc) com Detecção por Espectrometria de Massa (Ms) em Macerados de Lotes de Rolhas de Cortiça ou em Vinho", *Ciência Téc. Vitiv.* 17 (2), 61-71, 2002.
- 89 J. Pawliszyn: "Theory of Solid Microextraction", *J. Chromatogr. Sci.* 38, 270-278, 2000.
- 90 Z. Zhang; J. Pawliszyn: "Headspace solid phase microextraction", *Anal. Chem.* 65, 1843-1852, 1999.
- 91 [http://www.ctc.ch/f\\_combi\\_pal\\_specifications.htm](http://www.ctc.ch/f_combi_pal_specifications.htm), Outubro 2008.

- 92 C. Almeida; P. Rosário; P. Serôdio; J. M. F. Nogueira: "Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica", Departamento de Química e Bioquímica e Centro de Ciências Moleculares e Materiais, FCUL, 2004.
- 93 D. C. Harris: "Análise Química Quantitativa" 6ª edição, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. 583-590, 2003.
- 94 V. Mani; J. Pawliszyn: Cap. 5- "Applications of Solid Phase Microextraction", ed.: Royal Society Chemistry Cambridge, 1999.
- 95 M. Miyazawa; Y. Nakamura; Y. Ishikawa: "Insecticidal sesquiterpene from *Alpinia oxyphylla* against *Drosophila melanogaster*", J. Agric. Food Chem. 48, 3639-3641, 2000.
- 96 H. Lord; J. Pawliszyn: "Evolution of Solid Phase Microextraction Technology - Review", J. Chromatogr. A 885, 153-193, 2000.
- 97 S. Rocha; P. Coutinho; A. Barros; I. Delgadillo; M. A. Coimbra: "Rapid tool for distinction of wines based on global volatile signature", J. Chromatogr. A 1114, 188-197, 2006.
- 98 K. N. Graham; L. P. Sarna; G. R. B Webster; J. D. Gaynor; H. Y. F Ng: "Solid-phase microextraction of the herbicide metolachlor in runoff and tile-drainage water samples", J. Chromatogr. A 725, 129-136, 1996.
- 99 R. Shirey: "Optimization of extraction conditions for low molecular weight analytes using solid phase microextraction", J. Chromatogr. Sci. 38, 109-116, 2000.
- 100 R. Shirey: "Optimization of extraction conditions and fiber selection for semivolatile analytes using solid-phase microextraction", J. Chromatogr. Sci. 38, 279-288, 2000.
- 101 S. Rocha; V. Ramalheira; A. Barros; I. Delgadillo; M. A. Coimbra: "Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Retention Factors in a Wine Model", J. Agric. Food Chem. 49, 5142-5151, 2001.
- 102 G. Burns: "TCA in corks, Cork Soaks and Bottled Wine", Reno– EUA, ASEV Annual Meeting.
- 103 R. Alzaga; L. Ortiz; F. Sánchez-Baeza; P. Marco; J. Bayona: "Accurate determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines at low parts per trillion by solid phase microextraction followed by GC-ECD", J. Agric. Food Chem. 51, 3509-3514, 2003.
- 104 C. Fisher; U. Fisher: "Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction", J. Agric. Food Chem. 45, 1995-1997, 1997.
- 105 T. J. Evans; C. E. Butzke, S. E. Ebeler: "Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to GC/MS", J. Chromatogr. A 786, 293-298, 1997.
- 106 A. Maryinez-Uruñuela; J. M. Pizarro: "Optimization of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine", J. Chromatogr. A 1056, 49-56, 2004.

- 107 E. Lizarraga; A. Irigoyen; V. Belsue; E. Gonzalez-Penas: "Determination of chloroanisoles compounds in red wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry", J. Chromatogr. A 1052, 145-149, 2004.
- 108 A. Hoffman; W. R. Sponholz; F. David; P. Sandra: "Corkiness in wine- trace analysis of 2,4,6- trichloroanisole by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC/MS", Gerstel. App. Note, 3/2000, 2000.
- 109 Guia Relacre 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Ed. Fevereiro 2000.
- 110 ISO 8466-1ISO Water quality - Calibration and Evaluation of Analytical Methods and Estimation of Performance Characteristics. Part 1: Statistical Evaluation of the Linear Calibration Function. International Organization for Standardization, Geneva, CH.
- 111 C. A. F. Lima: "The importance of cork stoppers for wine bottling", 9th International Oenological Symposium 597-606, Caiscais, Portugal, 1990.
- 112 R. Milheiro da Costa: "A rolha de cortiça natural no Mundo", Forum Mundial da Cortiça, Filcork, Lisboa, Portugal, 1983.
- 113 Anónimo: "Indústria da cortiça: Manual de Prevenção". Lisboa Ed. CTCOR/IDICT, 2001.
- 114 P. V. Neto; A. L. Cardoso: "Alterações organolépticas: Perfil de concentrações de TCA e relação com a rolha", Actas do congresso Int. Cortiça, Lisboa, 354-361, 1997.
- 115 ISO/CD 20752.2 Cork Stoppers – Determination of releasable 2,4,6-trichloroanisole (TCA)
- 116 J. Maroco, Análise Estatística com utilização do SPSS, 3ª Ed, Edições Sílabo.
- 117 J. N. Miller & J. C. Miller, "Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry", 4th Edition, Pears.



## **Anexo 1 – Tabelas de Frequência por Fornecedor, Calibre e Qualidade**

F1 45x24 Flôr			
BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	3	8%	8%
1,5	13	33%	41%
3,0	19	49%	90%
3,7	4	10%	100%
5,0	0	0%	100%
6,3	0	0%	100%
7,6	0	0%	100%
8,9	0	0%	100%
10,2	0	0%	100%
11,5	0	0%	100%
12,8	0	0%	100%
14,1	0	0%	100%
15,4	0	0%	100%
16,7	0	0%	100%
18,0	0	0%	100%
19,3	0	0%	100%
20,6	0	0%	100%
21,9	0	0%	100%
23,2	0	0%	100%
24,5	0	0%	100%

F1 45x24 Extra			
BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	5	5%	5%
1,5	22	21%	25%
3,0	49	46%	71%
10,0	31	29%	100%
11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%

F1 45x24 Superior			
BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	9	17%	17%
1,5	18	34%	51%
3,0	20	38%	89%
10,0	6	11%	100%
11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%

F1 45x24 1º				F1 45x24 2º				F1 45x24 3º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	2	3%	3%	0,0	3	4%	4%	0,0	0	0%	0%
1,5	23	34%	37%	1,5	24	28%	32%	1,5	15	19%	19%
3,0	29	43%	81%	3,0	34	40%	72%	3,0	28	36%	55%
10,0	13	19%	100%	12,0	24	28%	100%	17,0	35	45%	100%
11,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%	18,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%	19,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%	20,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%	22,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%	23,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%	24,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%	26,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%	27,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%	28,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%	30,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%	31,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%	32,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%	33,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%	35,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%	36,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%	37,8	0	0%	100%

F1 49x24 Flôr			
BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	2	29%	29%
1,5	2	29%	57%
3,0	2	29%	86%
3,7	1	14%	100%
5,0	0	0%	100%
6,3	0	0%	100%
7,6	0	0%	100%
8,9	0	0%	100%
10,2	0	0%	100%
11,5	0	0%	100%
12,8	0	0%	100%
14,1	0	0%	100%
15,4	0	0%	100%
16,7	0	0%	100%
18,0	0	0%	100%
19,3	0	0%	100%
20,6	0	0%	100%
21,9	0	0%	100%

F1 49x24 Extra			
BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	1	6%	6%
1,5	4	25%	31%
3,0	7	44%	75%
10,0	4	25%	100%
11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%

F2 45x24 Flôr				F2 45x24 Extra				F2 45x24 Superior			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%	0,0	0	0%	0%	0,0	1	6%	6%
1,5	1	17%	17%	1,5	0	0%	0%	1,5	2	11%	17%
3,0	4	67%	83%	3,0	10	67%	67%	3,0	13	72%	89%
3,7	1	17%	100%	10,0	5	33%	100%	10,0	2	11%	100%
5,0	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%
6,3	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
7,6	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
8,9	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
10,2	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
11,5	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
12,8	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
14,1	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
15,4	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
16,7	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
18,0	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
19,3	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
20,6	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
21,9	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
23,2	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
24,5	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F2 45x24 1º				F2 45x24 2º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%	0,0	1	3%	3%
1,5	7	12%	12%	1,5	5	15%	18%
3,0	26	44%	56%	3,0	19	58%	76%
10,0	26	44%	100%	12,0	8	24%	100%
11,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%

F3 45x24 Extra				F3 45x24 Superior				F3 45x24 1º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%	0,0	0	0%	0%	0,0	2	20%	20%
1,5	4	33%	33%	1,5	0	0%	0%	1,5	0	0%	20%
3,0	7	58%	92%	3,0	1	50%	50%	3,0	5	50%	70%
10,0	1	8%	100%	10,0	1	50%	100%	10,0	3	30%	100%
11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F3 45x24 2º				F3 45x24 3º				F3 45x24 4º/5º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	3	33%	33%	0,0	2	15%	15%	0,0	0	0%	0%
1,5	2	22%	56%	1,5	4	31%	46%	1,5	1	33%	33%
3,0	4	44%	100%	3,0	4	31%	77%	3,0	0	0%	33%
12,0	0	0%	100%	12,0	3	23%	100%	12,0	2	67%	100%
13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%
14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%
15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%
17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%
18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%
19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%
21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%
22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%
23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%
25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%
26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%
27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%
28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%
30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%
31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%
32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%



F4 45x24 Extra				F4 45x24 Superior				F4 45x24 1º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%	0,0	3	50%	50%	0,0	2	67%	67%
1,5	3	60%	60%	1,5	1	17%	67%	1,5	1	33%	100%
3,0	2	40%	100%	3,0	2	33%	100%	3,0	0	0%	100%
10,0	0	0%	100%	10,0	0	0%	100%	10,0	0	0%	100%
11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F4 45x24 2º				F4 45x24 3º				F4 45x24 4º/5º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	1	17%	17%	0,0	2	67%	67%	0,0	0	0%	0%
1,5	5	83%	100%	1,5	1	33%	100%	1,5	0	0%	0%
3,0	0	0%	100%	3,0	0	0%	100%	3,0	0	0%	0%
12,0	0	0%	100%	12,0	0	0%	100%	12,0	1	100%	100%
13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%
14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%
15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%
17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%
18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%
19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%
21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%
22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%
23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%
25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%
26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%
27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%
28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%
30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%
31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%
32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%

F4 49x24 Flôr				F4 49x24 Extra			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%	0,0	5	26%	26%
1,5	1	100%	100%	1,5	6	32%	58%
3,0	0	0%	100%	3,0	7	37%	95%
10,0	0	0%	100%	10,0	1	5%	100%
11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F4 54x24 Flôr				F4 54x24 Extra			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	3	50%	50%	0,0	2	50%	50%
1,5	2	33%	83%	1,5	0	0%	50%
3,0	1	17%	100%	3,0	2	50%	100%
10,0	0	0%	100%	10,0	0	0%	100%
11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F5 45x24 Flôr				F5 45x24 Extra				F5 45x24 Superior			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	1	25%	25%	0,0	1	9%	9%	0,0	0	0%	0%
1,5	1	25%	50%	1,5	2	18%	27%	1,5	4	44%	44%
3,0	2	50%	100%	3,0	5	45%	73%	3,0	3	33%	78%
10,0	0	0%	100%	10,0	2	18%	91%	10,0	2	22%	100%
11,3	0	0%	100%	11,3	1	9%	100%	11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F5 45x24 1º				F5 45x24 2º				F5 45x24 3º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%	0,0	0	0%	0%	0,0	0	0%	0%
1,5	2	18%	18%	1,5	2	20%	20%	1,5	1	7%	7%
3,0	5	45%	64%	3,0	4	40%	60%	3,0	8	57%	64%
10,0	4	36%	100%	12,0	4	40%	100%	12,0	5	36%	100%
11,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%

F6 45x24 Extra				F6 45x24 2º				F6 45x24 4º/5º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%	0,0	1	4%	4%	0,0	0	0%	0%
1,5	3	30%	30%	1,5	0	0%	4%	1,5	0	0%	0%
3,0	4	40%	70%	3,0	16	59%	63%	3,0	1	50%	50%
10,0	3	30%	100%	12,0	10	37%	100%	12,0	1	50%	100%
11,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%

F6 49x24 Extra			
BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	4	21%	21%
1,5	4	21%	42%
3,0	7	37%	79%
10,0	4	21%	100%
11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%

F6 49x24 Superior			
BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%
1,5	0	0%	0%
3,0	5	50%	50%
10,0	5	50%	100%
11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%



F7 45x24 Extra				F7 45x24 Superior				F7 45x24 1º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	1	11%	11%	0,0	1	13%	13%	0,0	1	20%	20%
1,5	3	33%	44%	1,5	2	25%	38%	1,5	3	60%	80%
3,0	3	33%	78%	3,0	5	63%	100%	3,0	1	20%	100%
10,0	2	22%	100%	10,0	0	0%	100%	10,0	0	0%	100%
11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F7 45x24 2º				F7 45x24 3º				F7 45x24 4º/5º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	1	14%	14%	0,0	0	0%	0%	0,0	0	0%	0%
1,5	1	14%	29%	1,5	2	18%	18%	1,5	0	0%	0%
3,0	3	43%	71%	3,0	6	55%	73%	3,0	9	69%	69%
12,0	2	29%	100%	12,0	3	27%	100%	12,0	4	31%	100%
13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%
14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%
15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%
17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%
18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%
19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%
21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%
22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%
23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%
25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%
26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%
27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%
28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%
30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%
31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%
32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%

F7 49x24 Flôr				F7 49x24 Extra			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	4	31%	31%	0,0	3	25%	25%
1,5	2	15%	46%	1,5	3	25%	50%
3,0	5	38%	85%	3,0	5	42%	92%
10,0	2	15%	100%	10,0	1	8%	100%
11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F8 45x24 Flôr				F8 45x24 Extra				F8 45x24 Superior			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	1	50%	50%	0,0	0	0%	0%	0,0	0	0%	0%
1,5	1	50%	100%	1,5	4	44%	44%	1,5	0	0%	0%
3,0	0	0%	100%	3,0	4	44%	89%	3,0	1	100%	100%
3,7	0	0%	100%	10,0	0	0%	89%	10,0	0	0%	100%
5,0	0	0%	100%	11,3	0	0%	89%	11,3	0	0%	100%
6,3	0	0%	100%	12,6	0	0%	89%	12,6	0	0%	100%
7,6	0	0%	100%	13,9	1	11%	100%	13,9	0	0%	100%
8,9	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
10,2	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
11,5	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
12,8	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
14,1	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
15,4	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
16,7	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
18,0	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
19,3	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
20,6	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
21,9	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
23,2	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
24,5	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F8 45x24 1º				F8 45x24 2º				F8 45x24 3º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%	0,0	0	0%	0%	0,0	1	8%	8%
1,5	1	13%	13%	1,5	4	27%	27%	1,5	3	25%	33%
3,0	4	50%	63%	3,0	8	53%	80%	3,0	7	58%	92%
10,0	3	38%	100%	12,0	3	20%	100%	12,0	1	8%	100%
11,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%

F8 45x24 4º/5º

BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	0	0%	0%
1,5	1	8%	8%
3,0	6	50%	58%
12,0	4	33%	92%
13,3	1	8%	100%
14,6	0	0%	100%
15,9	0	0%	100%
17,2	0	0%	100%
18,5	0	0%	100%
19,8	0	0%	100%
21,1	0	0%	100%
22,4	0	0%	100%
23,7	0	0%	100%
25,0	0	0%	100%
26,3	0	0%	100%
27,6	0	0%	100%
28,9	0	0%	100%
30,2	0	0%	100%
31,5	0	0%	100%
32,8	0	0%	100%

F8 49x24 Flôr

BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	2	11%	11%
1,5	9	50%	61%
3,0	6	33%	94%
10,0	1	6%	100%
11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%

F8 49x24 Extra				F8 49x24 Superior				F8 49x24 1º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	1	6%	6%	0,0	0	0%	0%	0,0	1	13%	13%
1,5	9	50%	56%	1,5	0	0%	0%	1,5	4	50%	63%
3,0	7	39%	94%	3,0	1	50%	50%	3,0	3	38%	100%
10,0	1	6%	100%	10,0	1	50%	100%	10,0	0	0%	100%
11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F8 54x24 Flôr			
BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	7	47%	47%
1,5	4	27%	73%
3,0	3	20%	93%
3,7	1	7%	100%
5,0	0	0%	100%
6,3	0	0%	100%
7,6	0	0%	100%
8,9	0	0%	100%
10,2	0	0%	100%
11,5	0	0%	100%
12,8	0	0%	100%
14,1	0	0%	100%
15,4	0	0%	100%
16,7	0	0%	100%
18,0	0	0%	100%
19,3	0	0%	100%
20,6	0	0%	100%
21,9	0	0%	100%
23,2	0	0%	100%
24,5	0	0%	100%

F8 54x24 Superior			
BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	1	50%	50%
1,5	1	50%	100%
3,0	0	0%	100%
10,0	0	0%	100%
11,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%



F9 45x24 Flôr				F9 45x24 Extra				F9 45x24 Superior			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	2	13%	13%	0,0	0	0%	0%	0,0	0	0%	0%
1,5	5	31%	44%	1,5	1	50%	50%	1,5	0	0%	0%
3,0	7	44%	88%	3,0	1	50%	100%	3,0	2	100%	100%
3,7	1	6%	94%	10,0	0	0%	100%	10,0	0	0%	100%
5,0	0	0%	94%	11,3	0	0%	100%	11,3	0	0%	100%
6,3	1	6%	100%	12,6	0	0%	100%	12,6	0	0%	100%
7,6	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%	13,9	0	0%	100%
8,9	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%	15,2	0	0%	100%
10,2	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%	16,5	0	0%	100%
11,5	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%	17,8	0	0%	100%
12,8	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%	19,1	0	0%	100%
14,1	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%	20,4	0	0%	100%
15,4	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%	21,7	0	0%	100%
16,7	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%	23,0	0	0%	100%
18,0	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%	24,3	0	0%	100%
19,3	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%	25,6	0	0%	100%
20,6	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%	26,9	0	0%	100%
21,9	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%	28,2	0	0%	100%
23,2	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%	29,5	0	0%	100%
24,5	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%	30,8	0	0%	100%

F9 45x24 1º				F9 45x24 2º				F9 45x24 3º			
BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada	BINS	Frequência	%	% Acumulada
0,0	3	11%	11%	0,0	2	7%	7%	0,0	0	0%	0%
1,5	6	21%	32%	1,5	7	23%	30%	1,5	7	33%	33%
3,0	16	57%	89%	3,0	12	40%	70%	3,0	9	43%	76%
10,0	3	11%	100%	12,0	9	30%	100%	12,0	5	24%	100%
11,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%	13,3	0	0%	100%
12,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%	14,6	0	0%	100%
13,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%	15,9	0	0%	100%
15,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%	17,2	0	0%	100%
16,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%	18,5	0	0%	100%
17,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%	19,8	0	0%	100%
19,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%	21,1	0	0%	100%
20,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%	22,4	0	0%	100%
21,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%	23,7	0	0%	100%
23,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%	25,0	0	0%	100%
24,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%	26,3	0	0%	100%
25,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%	27,6	0	0%	100%
26,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%	28,9	0	0%	100%
28,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%	30,2	0	0%	100%
29,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%	31,5	0	0%	100%
30,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%	32,8	0	0%	100%